

T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE NANCY

pour obtenir le grade de Docteur-Ingénieur
par

Bruno DUTEURTRE

PREMIERE THESE

Etude de l'assimilation de la proline par les levures de brasserie.

DEUXIEME THESE

Proposition donnée par la Faculté.

Soutenues le 16 Mars 1970
devant la commission d'examen.

MM. - R.GAY	Président
- HANSENOT	Examineur
- CHADON	1
- GALZY	2
- FETCHE	3



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551914_0008

P R E M I E R E T H E S E

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE NANCY

par

Bruno DUTEURTRE

Sujet : Etude de l'assimilation de la proline par les levures de
Brasserie.

Soutenue le 16 Mars 1970

Devant la commission d'examen

MM. R. GAY	Président
MANCENOT	Examineur
CHAPON	J
GALLY	V
HOTCHE	U

1881 1882 1883

1884 1885 1886

1887 1888 1889

1890 1891 1892

1893

1894 1895 1896

1897 1898 1899



1900

1901 1902 1903

1904 1905 1906

1907

1908

1909

DOYEN : M. AUBRYASSESEUR : M. GAYDoyens honoraires : MM. CORNUBERT - ROUBAULTProfesseurs honoraires : MM. RAYBAUD - LAFFITTE - LERAY - JOLY - LAPORTE - EICHBORN - CAPELLE - GODEMENT - DUBREIL - L. SCHWARTZ - DIEUDONNE - LONGCHAMON - LETORT - DODE - GAUTHIER - GOUDET - OLMER - CORNUBERT - CHAPELLE - GUERIN - WAHLMaîtres de Conférences honoraires : MM. LIENHART - PIERRET - M^{lle} MATHIEUPROFESSEURS

MM. ROUBAULT	Géologie	GAYET	Physiologie
VEILLET	Biologie Animale	HADNI	Physique
BARRIOL	Chimie théorique	* BASTICK	Chimie
BIZETTE	Physique	DUCHAUFOUR	Pédologie
GUILLIEN	Electronique	GARNIER	Agronomie
LEGRAS	Mécanique Rationnelle	NEEL	Chimie Organ. Ind
BOLFA	Minéralogie	BERNARD	Géologie Appliquée
NICLAUSE	Chimie	* CHAMPIER	Physique
FAIVRE	Physique Appliquée	* GAY	Chimie Biologique
AUBRY	Chimie Minérale	STEPHAN	Zoologie
COPPENS	Radiogéologie	* CONDE	Zoologie
DUVAL	Chimie	* WERNER	Botanique
FRUHLING	Physique	EYMARD	Calcul Différentiel et Intégral
HILLY	Géologie	LEVISALLES	Chimie Organique
LE GOFF	Génie Chimique	FELDEN	Physique
SUHNER	Physique Expérimentale	* GOSSE	Mécanique Physique
CHAPON	Chimie Biologique	* DAVOINE	Physique (ENSMIN)
HEROLD	Chimie Minérale Industrielle	HORN	Physique (1 ^{er} Cycle)
SCHWARTZ B.	Exploitation Minière	* ROCOI	Géologie
MALAPRADE	Chimie	DELPUECH	Chimie Physique
* MANGENOT	Botanique		

N....	Chimie Biologique
N....	Mécanique Appliquée
N....	Analyse Supérieure
N....	Méthodes Mathématiques de la Physique
N....	Mécanique Rationnelle

(*) Professeur titulaire à titre personnel

PROFESSEURS SANS CHAIRE

me BASTICK	Chimie P.C. EPINAL	BALESDENT	Thermodynamique, Chimie
M. GUDEFIN	Physique		Appliquée (ENSIC)
VUILLAUME	Psychophysiologie	BLAZY	Minéralogie Appliquée (ENSG)
FRENTZ	Biologie Animale	JANOT	Physique P.C. EPINAL
MARI	Chimie (ISIN)	CACHAN	Entomologie Appliquée (ENSA)
AUROUZE	Géologie	JACQUIN	Pédologie et Chimie agricole
DEVIOT	Physique du Solide	MAINARD	Physique M.P.
FLECHON	Physique P.C.	MARTIN	Chimie P.C.
Ille HUET	Mathématiques C.B.G.	PAULMIER	Mécanique Expérimentale
VIGNES	Métallurgie	PROTAS	Minéralogie
JURAIN	Géologie C.B.G.		

MAITRES DE CONFÉRENCES

M. JOZEFOWICZ	Physico-Chimie	GERL	Physique (ENSEM)
RIVAIL	Chimie Appliquée (CUCES)	ROQUES	Chimie Minérale
VILLERMAUX	Génie Chimique	FERRIER	Mathématiques
METCHE	Biochimie Appliquée (Brasserie)	GILORMINI	Mécanique (ISIN)
PAIR	Mathématiques Appliquées	DEXHEIMER	Botanique
BAUMANN	Physique 1 ^{er} Cycle	CASTRO	Chimie Organique
DURAND	Physique	N...	Mécanique des Fluides (ISIN)
GRANGE	Physique (ISIN)	N...	Mathématiques
DEPAIX	Probabilités et Statistiques	N...	Mathématiques P.C.
BAVEREZ	Chimie (ENSIC)	N...	Mathématiques C.B.G.
CHAMBON	Exploitation Minière (Mines)	N...	Physiologie Animale
HUSSON	Physique (ENSEM)	N...	Mathématiques M.P.
WEISSLINGER	Physique	N...	Chimie Organique
			Chimie (ENSIC)
			Mathématiques

CHARGES D'ENSEIGNEMENTS

M. AMARIGLIO -- COEURE -- DAYRAINVILLE -- GIRARDEAU -- HILLY -- MAURIN -- NOVERRAZ -- OVAERT -- RUYER -- WEBER.

A M E S P A R E N T S

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur R. GAY, Directeur de l'ECOLE SUPERIEURE DE BRASSERIE, DE MALTERIE ET DE BIOCHIMIE APPLIQUEE DE NANCY, qui m'a vivement encouragé à préparer une thèse de Docteur-Ingénieur, sous la direction de monsieur C. BOURGEOIS, Maître-assistant et Professeur de Microbiologie à l'Ecole.

Je suis très reconnaissant à Monsieur C. BOURGEOIS de l'aide et des nombreux conseils qu'il m'a prodigués, grâce auxquels j'ai pu mener à bien cette étude.

Je remercie Monsieur B. CHOLLOT, Maître-Assistant et Professeur à l'Ecole, pour sa bienveillance et ses conseils fructueux.

Je remercie enfin :

- M. le Professeur R. GAY, Président du Jury
- MM. les Professeurs MANGENOT - CHAPON - GALZY - METCHEL
qui ont bien voulu accepter d'examiner ce travail.

Je tiens à exprimer ma vive gratitude envers la Faculté des Sciences de NANCY et monsieur B. DEYMIE, Directeur du CENTRE TECHNIQUE DE LA BRASSERIE ET MALTERIE FRANCAISES, qui m'ont permis d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions.

Introduction

Bibliographie

- A) Pénétration des Acides Aminés dans la cellule de levure
- B) Mécanisme de l'assimilation des acides aminés chez les levures
 - 1. Mécanisme d'Ehrlich
 - 2. Mécanisme de Stickland
 - 3. L'assimilation directe
 - 4. L'assimilation des ions NH_4^+
- C) Métabolisme de la Proline
 - 1. Biosynthèse de la proline chez les microorganismes
 - 2. Catabolisme de la proline

Méthodes Analytiques

- A) Conditions de culture
 - 1. Milieu de culture utilisé
 - 2. Souche de levure utilisée
 - 3. Conditions de culture
 - 4. Contrôle de développement
- B) Extraction des Acides Aminés
- C) Dosage des Acides Aminés
- D) Dosage particulier de la proline
 - 1. Méthode de WREN et WIGGALL .
 - 2. Utilisation de ^{14}C Proline

E) Dosage de l'ion Ammonium

F) Dosage de la Proline Oxydase

Résultats obtenus au cours de nos recherches

A) Etude du comportement de la levure vis à vis de la proline

1. Croissance

2. Evolution des concentrations en azote dans le milieu

3. Etude des concentrations intracellulaires

a) pool des amino-acides

b) évolution du pool de la proline lors de l'addition de proline dans le milieu durant la croissance.

4. Discussion

B) Etude du Catabolisme de la Proline

C) Action de l'O₂ sur la biosynthèse enzymatique

1. Proline Oxydase

2. Proline Perméase

Conclusion

Bibliographie

I N T R O D U C T I O N

* * *

L'absorption et l'utilisation intracellulaire des acides aminés représentent un problème biologique intéressant de la nutrition des organismes saprophytes. Il se pose en particulier dans le cas de la levure de bière se développant sur du moût et il a fait l'objet de nombreuses études . Celles-ci ont révélé un comportement très particulier de la levure vis à vis de la proline .

Présente en quantité moyenne par rapport aux autres acides aminés dans l'orge, la proline devient l'acide aminé le plus important (environ $1/3$ de l'azote aminé) dans le malt (13). En effet, sa concentration croît régulièrement au cours des 8 jours de germination alors que la concentration des autres amino-acides ne croît que durant les 4 premiers jours et diminue ensuite (16).

Ainsi, la proline est le principal acide aminé du moût ($1/3$ de l'azote total aminé).

Au cours d'une fermentation basse, en anaerobiose, la proline n'est pratiquement pas attaquée, alors que 95 % des autres acides aminés ont disparu à la fin de la fermentation (15).

Au contraire, lors de fermentation haute, effectuée sur du moût, au laboratoire, en aerobiose, la proline est assimilée au cours de la dernière partie de celle-ci, après que tous les autres acides aminés l'aient été .

Dans la bière, la proline se trouve donc en quantité prépondérante par rapport aux autres acides aminés (la moitié du total), le contenu en proline restant pratiquement inchangé depuis le moût jusqu'à la bière finie.

Ce comportement particulier vis à vis de la proline nous a semblé mériter, tant du point de vue scientifique que du point de vue brassicole , une étude approfondie .

C'est pourquoi, dans un premier temps, nous allons faire le point de nos connaissances actuelles en ce qui concerne la proline.

A . Pénétration des acides aminés dans la cellule de levure.

Les acides aminés pénétreraient dans la cellule grâce à la perméabilité sélective des membranes cellulaires, par une séquence d'étapes dont la première, catalysée par une perméase, assure une étroite spécificité du système et une grande affinité pour l'acide aminé à transporter (25).

Les premières études sur les perméases (SURDIN et coll.) (30) ont fait penser que le système de transport des acides aminés chez les levures manquait de spécificité, comme celui de *Neurospora Crassa* ou des cellules de mammifères, mais contrairement à celui des bactéries . Ainsi, tandis que chez celles-ci, l'entrée d'un acide aminé n'est inhibée que par les quelques amino-acides ayant une analogie structurale marquée avec l'acide aminé étudié chez *Neurospora Crassa* comme chez *Saccharomyces Cerevisiae* de nombreux cas d'inhibition par un certain nombre d'acides aminés différents furent mis en évidence (5 - 31)

Des études plus récentes (9) semblent montrer que chez les levures, comme chez *Neurospora Crassa*, on se trouve en présence d'une multiplicité d' amino-acides perméases, spécifique chacune d'un ou quelques acides aminés .

Cette contradiction apparente peut s'expliquer par la complexité du mécanisme d'entrée des métabolites qui comprend plusieurs opérations successives assurées par un système perméasique complexe .

a) Reconnaissance de la molécule à transporter par l'intermédiaire d'un enzyme spécifique : la perméase . C'est l'étape qui requiert le plus de spécificité et la plus grande affinité pour le substrat.

b) Transport du métabolite au travers de la barrière de perméabilité qui se ferait par l'intermédiaire d'un transporteur mobile de spécificité plus réduite. Ceci se ferait par formation de liaison hydrogène entre le métabolite et le transporteur mobile .

c) Libération du métabolite à l'intérieur de la cellule qui pourrait être spontanée ou catalysée par un enzyme.

Pour permettre la concentration d'un métabolite dans la cellule, des échanges énergétiques doivent intervenir ainsi que des mécanismes de régulation.

M. GRENSON et coll. (9,10,11) ont mis en évidence chez *Saccharomyces Cerevisiae* des systèmes perméasiques spécifiques, l'un pour l'arginine, un autre pour la lysine et un troisième pour la méthionine en mesurant la vitesse initiale de pénétration d'acides aminés marqués dans des cellules prélevées en phase exponentielle et en effectuant une représentation de LINEWEAVER-BURK (l'inverse de la vitesse en fonction de l'inverse de la concentration en substrat) .

Ainsi, dans le cas de l'arginine, seul un analogue structural : la L canavanine et un acide aminé basique : la L lysine exercent une action inhibitrice sur sa pénétration.

Dans le cas de la lysine, deux systèmes de pénétration auraient été mis en évidence : l'un hautement spécifique de la lysine et l'autre en commun avec d'autres amino-acides .

Des études analogues ont donné des résultats identiques dans le cas de la méthionine.

Au cours de ce travail, une nouvelle perméase spécifique de la proline a été mise en évidence chez *S.CHEVALIERE* par SCHWENCKE et coll.(26) . Cette découverte est venue à point pour nous aider à résoudre le problème que nous nous étions posé.

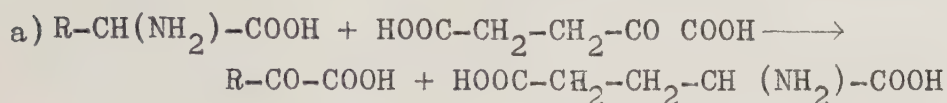
Ainsi, chez les levures, il n'y aurait pas une perméase unique, mais un grand nombre de perméases ; chacune serait spécifique d'un acide aminé, et une perméase de spécificité moindre permettrait l'incorporation de nombreux amino-acides .

B . Mécanisme de l'assimilation des acides aminés chez les levures

Il existe trois modes différents d'assimilation des acides aminés par les levures :

- le mécanisme d'Ehrlich
- le mécanisme de Stickland
- l'assimilation directe

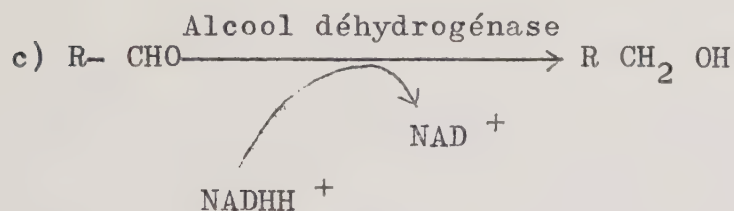
1) Le mécanisme d'Ehrlich (8-20-35) conduit par transamination à la formation d'acide glutamique intracellulaire à partir de l'acide α ceto glutarique intracellulaire qui fixerait l'ammoniac par l'intermédiaire du phosphate de pyridoxal ou vitamine B.6.

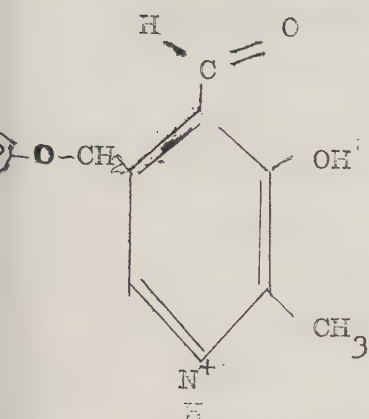


Une base de SCHIFF se forme d'abord par condensation d'un amino-acide avec le phosphate de pyridoxal, qui donne ensuite du phosphate de pyridoxamine et un acide α cétonique. Le phosphate de Pyridoxal est régénéré par combinaison d'un autre acide α cétonique et du phosphate de pyridoxamine avec production d'une autre molécule d'acide aminé.

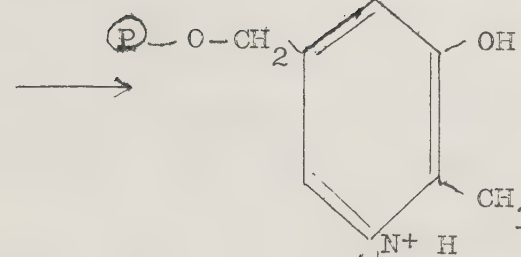
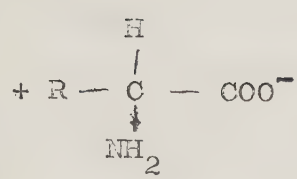
Le phosphate de pyridoxal et le phosphate de pyridoxamine sont tous les deux actifs en tant que coenzymes, lors de la transamination et ils peuvent activer différentes transaminases.

Après la réaction de transamination, les étapes du mécanisme d'Ehrlich sont les suivantes :

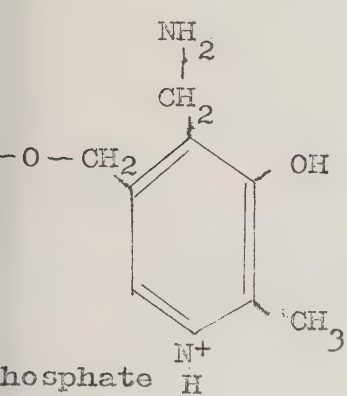




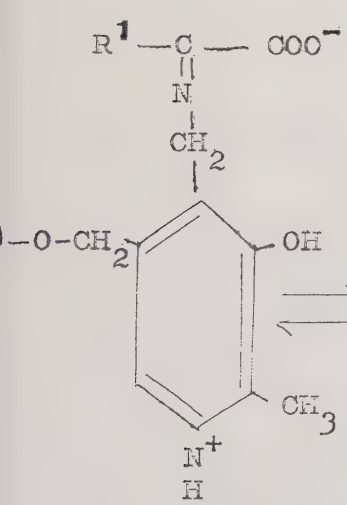
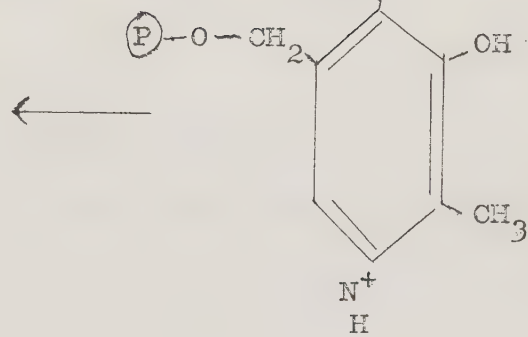
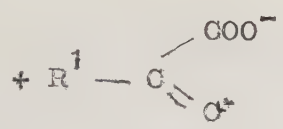
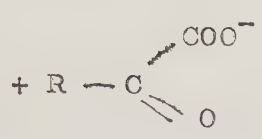
Phosphate de pyridoxal



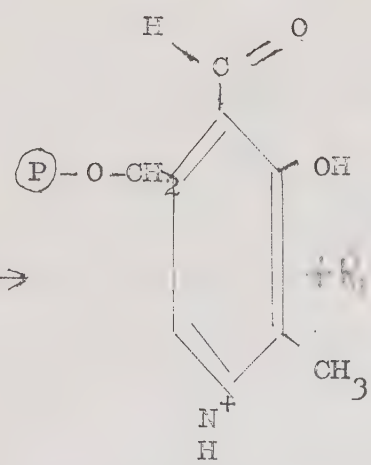
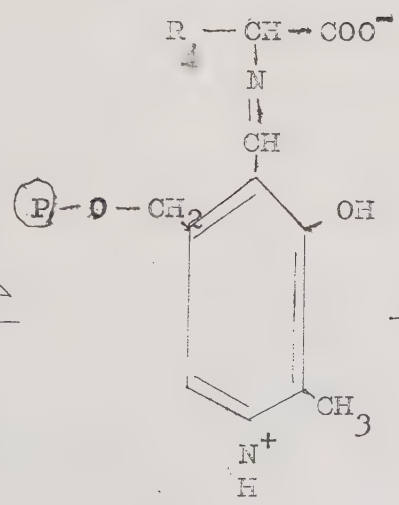
Base de Schiff



Phosphate de pyridoxamine



Base de Schiff



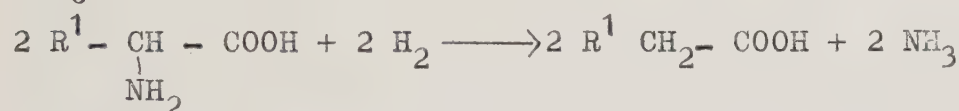
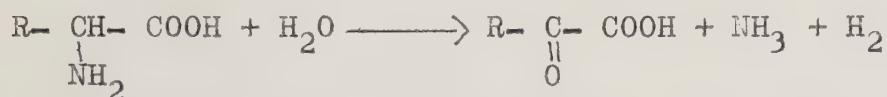
Phosphate de pyridoxal

Mécanisme d'action du phosphate de pyridoxal.

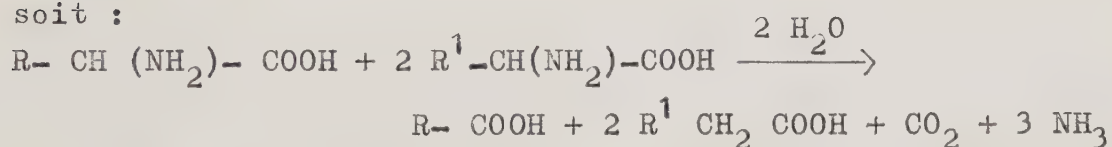
2) Le mécanisme de Stickland (8-35)

STICKLAND (29) qui étudiait le métabolisme d'une bactérie anaérobie *Clostridium Sporogenes*, constata que ce microorganisme obtenait son énergie par oxydation de certains acides aminés présents dans le milieu aux dépens de certains autres.

THORNE (33) a montré que la levure pouvait également initier la réaction de STICKLAND afin d'obtenir une nouvelle source d'ammoniac.

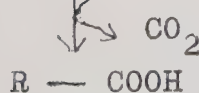
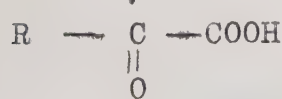
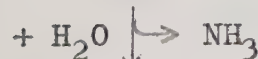
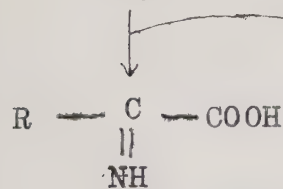
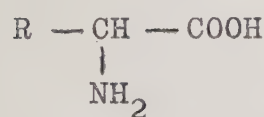


soit :

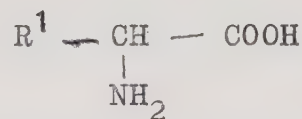


En anaérobiose, NISMAN et VINET (1949) suggèrent le mécanisme suivant :

Acide aminé donneur



Système transporteur



Acide aminé accepteur



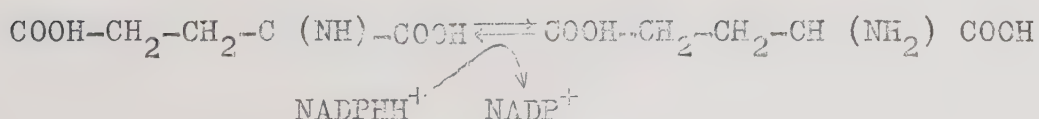
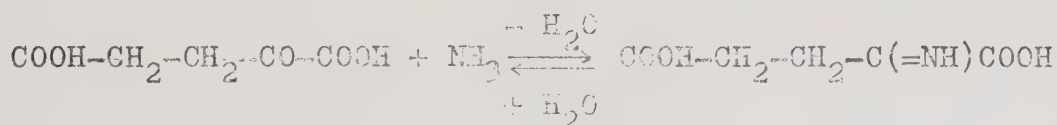
3) L'assimilation directe des acides aminés (8-35)

C'est THORNE qui a émis l'hypothèse suivante : lorsque la levure est mise en présence d'un mélange adéquat d'acides aminés, elle les assimile directement. Il apporte à l'appui de cette hypothèse les résultats d'un certain nombre d'expériences, parmi lesquelles la suivante : en présence d'un mélange d'acides aminés, la levure croît plus vite que sur un ou quelques acides aminés, ce qui s'explique par le fait que dans le premier cas, il n'y a pas déamination, mais seulement assimilation directe.

Cependant, des travaux récents (17) ont montré que l'idée d'une assimilation intacte des amino-acides par la levure ne peut plus être soutenue. Il existe au sein de la cellule de levure un système complexe de transaminases et des expériences faites avec des acides aminés marqués avec de l' ^{15}N ont montré que l'élément marqué se trouvait réparti parmi tous les autres amino-acides de la cellule de levure. L'absorption des amino-acides serait régie plutôt par l'ensemble des quantités d'amino-acides présents dans le milieu que par la concentration individuelle de chaque amino-acide.

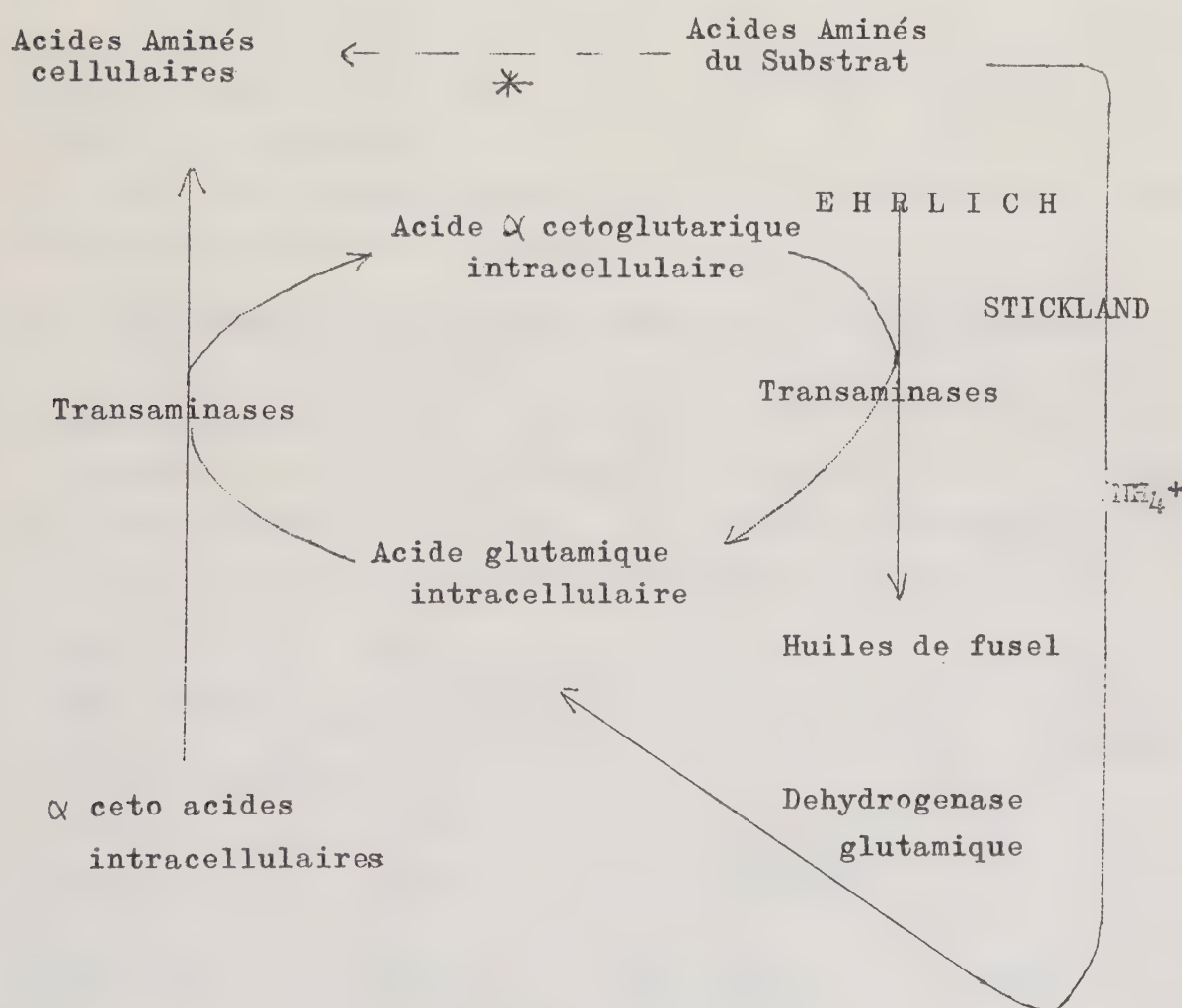
4) Assimilation des ions NH_4^+ (6, 8)

Les ions ammonium sont fixés sur l'acide α ceto-glutarique intracellulaire pour donner l'acide glutamique intracellulaire par l'intermédiaire de la déhydrogénase glutamique.



Chez de nombreux microorganismes, la fixation de l'ammoniac peut s'effectuer également par l'intermédiaire de l'acide

oxaloacétique pour donner l'acide aspartique. Un troisième acide aminé pourrait également intervenir : l'alanine. Cependant, d'après SIMS et FOLKES (27), la fixation de l'ammoniac se ferait essentiellement par la voie du glutamate chez la cellule de levure.



SCHEMA 1.- Assimilation des Acides Aminés .

* L'assimilation directe n'est plus guère admise (17).

C. Métabolisme de la Proline

Du point de vue biochimique, la proline fait partie de la famille du glutamate (ou α ceto glutarate), le glutamate étant un précurseur direct de la proline (22) . Cette famille comprend également l'arginine, la glutamine et l'acide glutamique .

ABELSON et VOGEL (1) proposent la séquence de réactions suivantes pour la biosynthèse des membres de la famille de l'acide glutamique (schéma II).

Dans notre étude, nous allons nous intéresser plus particulièrement au catabolisme de la proline puisqu'au cours des opérations effectuées en malterie et brasserie, les phénomènes cataboliques sont essentiels.

Chez les microorganismes comme chez les levures, ce catabolisme est d'ailleurs peu connu .

1) - Biosynthèse de la proline chez les microorganismes

VOGEL et DAVIS (36) ont étudié à l'aide de mutants la synthèse de la proline chez E.Coli et ils ont pu mettre ainsi en évidence le rôle d'intermédiaire joué par l'acide glutamique γ semi-aldéhyde et l'acide Δ_1 , pyrroline 5 carboxylique dans la transformation de l'acide glutamique en proline

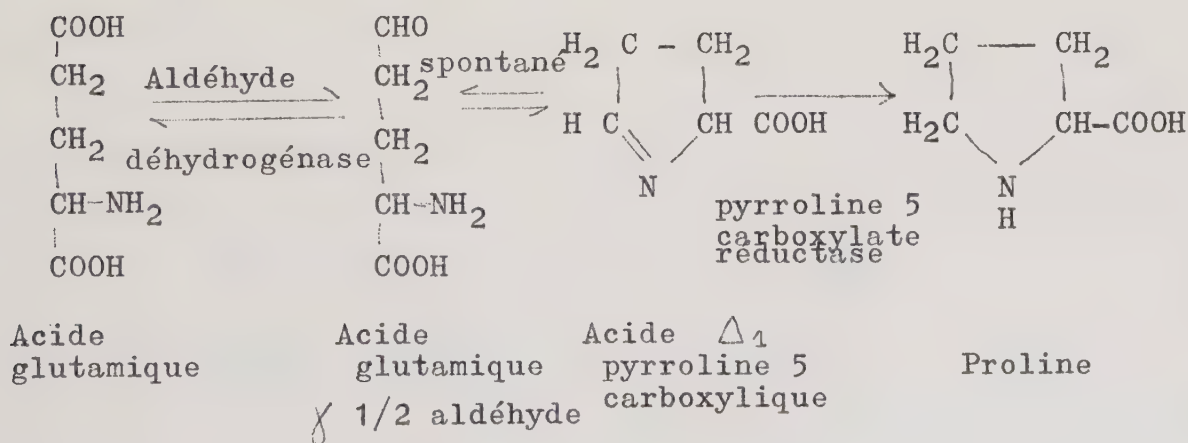
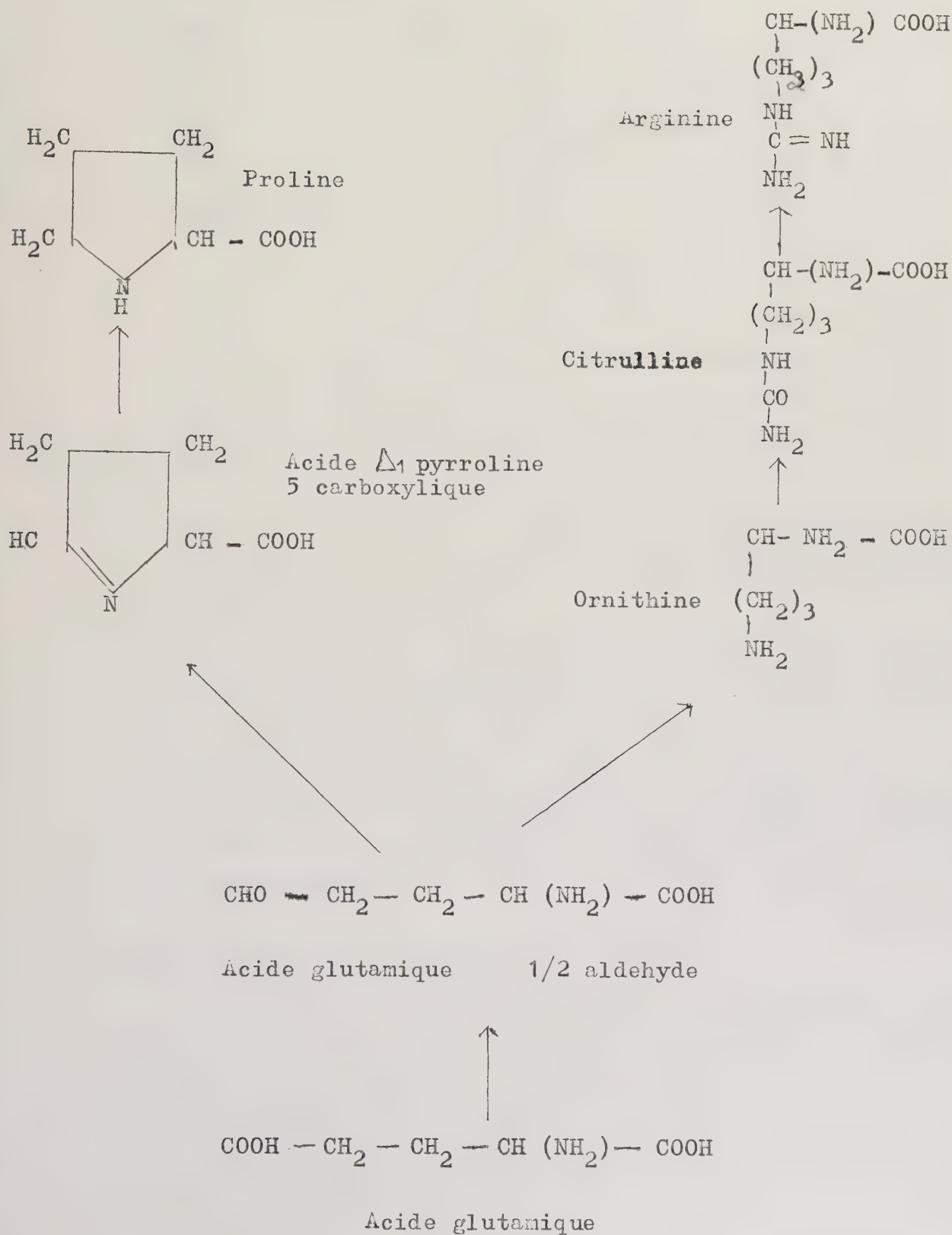
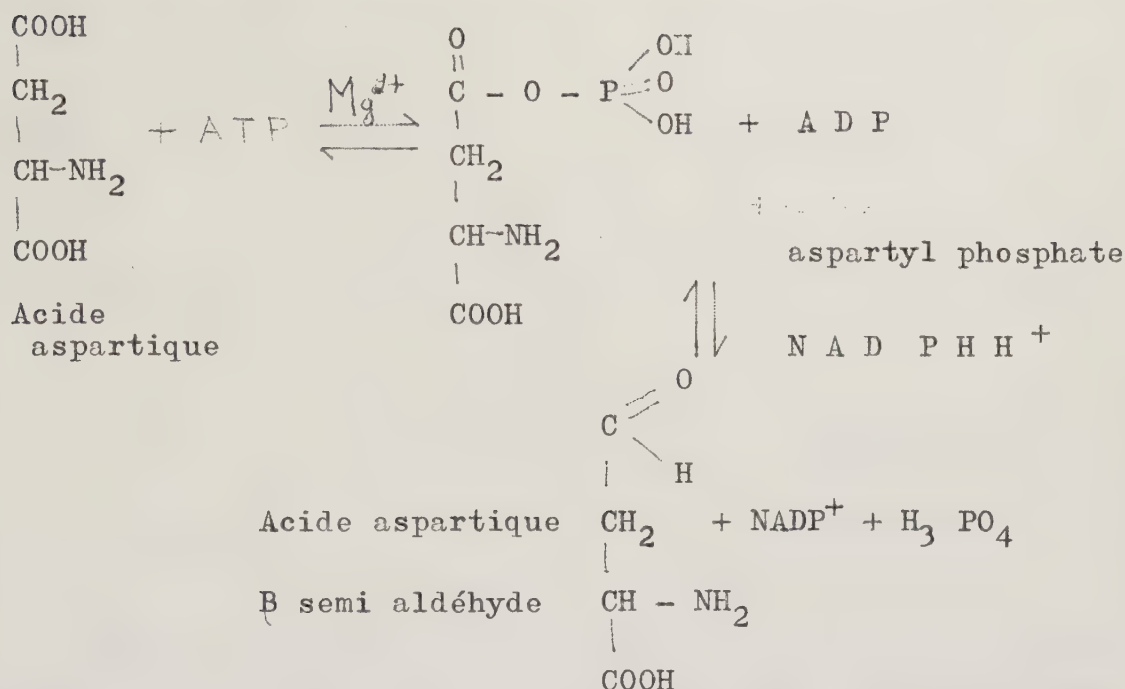


Schéma II : Biosynthèse de la proline et des acides aminés de la même famille. (MOAT A.G., AHMAD F., 1965) (22)



- a) la γ aldehyde pourrait être formée par des réactions analogues à celles mises en évidence par BLACK (2,21) pour la conversion d'acide aspartique en β aspartyl semi-aldéhyde

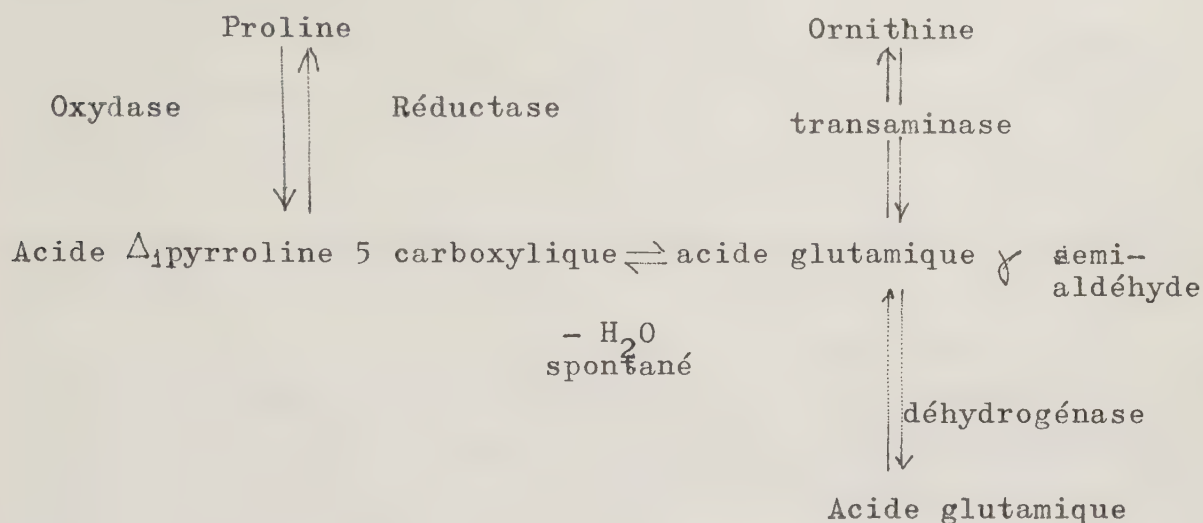


- b) Bien que la formation d'acide Δ_1 pyrroline 5 carboxylique soit démontrée, les détails de la transformation enzymatique sont encore mal connus .
- c) La Δ_1 pyrroline 5 carboxylate réductase a été partiellement purifiée et elle catalyserait la dernière étape de formation de la proline, NAD et NADP étant requis .
- d) Le passage de l'acide glutamique à la proline a également été mis en évidence chez *Neurospora Crassa* par VOGEL et BONNER(37), chez *Torula Utilis* par ABELSON ET VOGEL (1) et chez d'autres microorganismes .

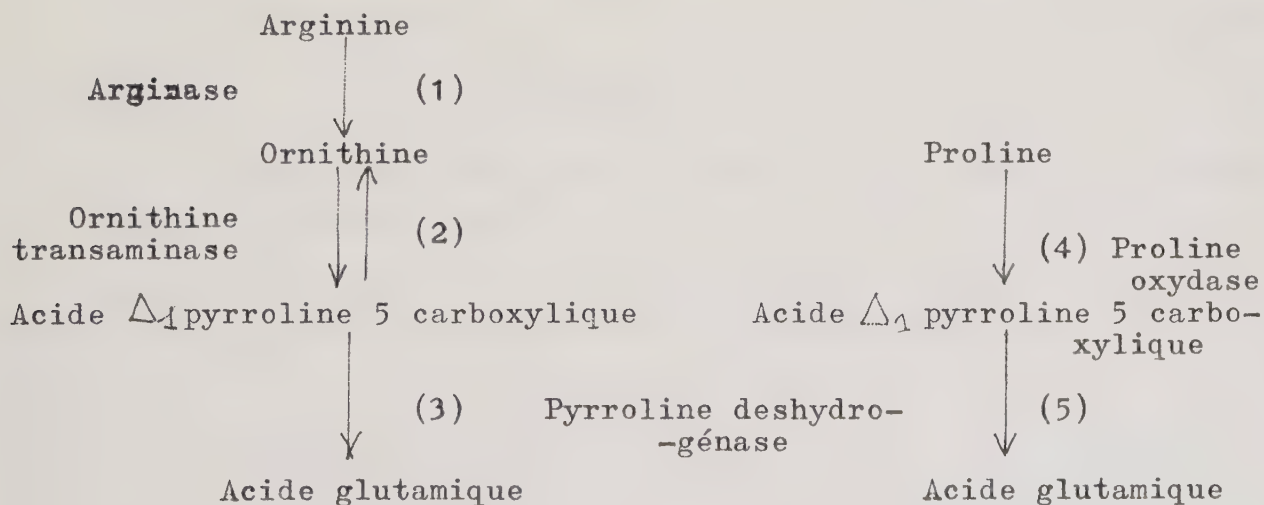
2)- Catabolisme de la proline

La formation du glutamate à partir de la proline serait catalysée par des enzymes différents de ceux qui catalysent la conversion de glutamate en proline . Ainsi, la Δ_1 pyrroline 5 carboxylate réductase ne catalyse pas l'oxydation de la proline, celle-ci se ferait par un enzyme semblable à la proline oxydase des tissus animaux (21) .

Chez N.Crassa, (7) les voies métaboliques réversibles menant de l'acide glutamique à l'ornithine et à la proline, divergent au niveau de la γ glutamyl semialdéhyde.



Bacillus Subtilis peut utiliser l'arginine ou la proline comme seule source d'azote, leur métabolisme conduisant dans les deux cas à l'acide glutamique qui sert de donneur général d'azote (12) ; les mêmes séquences enzymatiques ont été mises en évidence chez B. Licheniformis (19)



Les réactions 3 et 5 sont identiques pour les 2 séquences enzymatiques. En fait, de HAUWER, LAVALLE et WIAME (12) ont montré qu'il existe deux deshydrogénases différentes catalysant

1. The first part of the report is a general introduction to the subject of the study. It discusses the importance of the study and the objectives of the research.

2. The second part of the report is a detailed description of the methodology used in the study. It includes information about the sample size, the data collection methods, and the statistical analysis techniques.

3. The third part of the report is a presentation of the results of the study. It includes a summary of the findings and a discussion of the implications of the results.

4. The fourth part of the report is a conclusion and a list of references. The conclusion summarizes the main findings of the study and provides recommendations for future research.

5. The fifth part of the report is a list of references. It includes a list of all the sources used in the study, including books, articles, and other documents.

6. The sixth part of the report is a list of references. It includes a list of all the sources used in the study, including books, articles, and other documents.

7. The seventh part of the report is a list of references. It includes a list of all the sources used in the study, including books, articles, and other documents.

8. The eighth part of the report is a list of references. It includes a list of all the sources used in the study, including books, articles, and other documents.

9. The ninth part of the report is a list of references. It includes a list of all the sources used in the study, including books, articles, and other documents.

10. The tenth part of the report is a list of references. It includes a list of all the sources used in the study, including books, articles, and other documents.

la même réaction, l'une appartenant à l'opéron dont le fonctionnement est induit par l'arginine, l'autre à celui dont le fonctionnement est induit par la proline . Rappelons que l'opéron est formé par une série de gènes supposés adjacents sur le chromosome, qui déterminent la structure des enzymes d'une réaction.

D'autres voies du métabolisme de la proline, en particulier chez les mammifères ont été mises en évidence et sont représentées par le schéma III.

Plusieurs voies de biosynthèse et de dégradation de la proline ont donc été élucidées chez les microorganismes et en particulier chez *Neurospora Crassa* qui est un champignon ; mais chez *Saccharomyces cerevisiae*, la dégradation de la proline est encore mal connue .

Nous avons vu précédemment que la proline n'était pas assimilée par la levure en ~~anaer~~obiose dans des moûts de brasserie et ne l'était en aerobiose qu'après épuisement des autres sources azotées du milieu.

D'après ce que nous venons de voir, cette incapacité d'utiliser la proline pourrait être soit d'ordre catabolique, la proline n'étant pas dégradée pour des raisons à déterminer, soit d'ordre perméasique, la proline ne pénétrant pas à l'intérieur de la cellule de levure .

C'est à ces questions que nous allons essayer de répondre dans le présent travail .

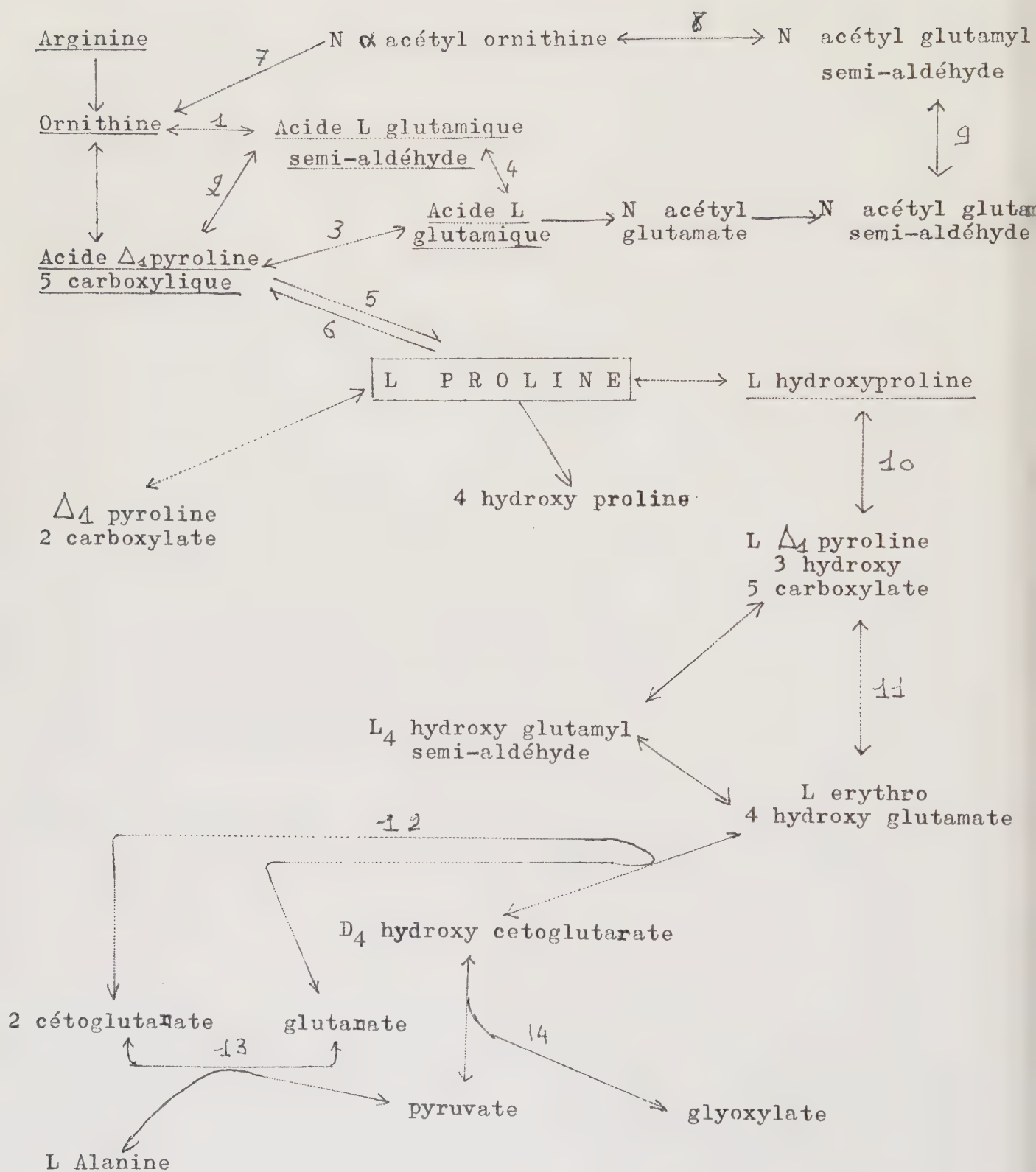


Schéma III : Voies du métabolisme de la proline chez les mammifères.
(Biochemical Pathways - 1968)

1. Transaminase .
2. Réaction spontanée .
3. Pyrroline 5 carboxylate déhydrogénase .
4. Aldéhyde déhydrogénase .
5. Pyrroline 5 carboxylate Réductase .
6. Proline Oxydase .
7. N $\times$ Acétyl Ornithase .
8. Acétyl Ornithine transaminase .
9. N Acétyl glutamate Réductase .
10. Pyrroline 5 carboxylate Réductase .
11. Pyrroline 5 carboxylate déhydrogénase .
12. Glutamate oxalo-acétate transaminase .
13. Glutamate pyruvate transaminase .
14. 2 ceto 9 hydroxy glutamate aldolase .

M E T H O D E S A N A L Y T I Q U E S

A. Conditions de culture

1) Milieu de culture utilisé

Le milieu de culture utilisé est un milieu bactériologique parfaitement défini : c'est le milieu de WICKERHAM utilisé couramment pour les tests d'assimilation de l'azote (Tableau I).

Quelle que soit la source azotée utilisée, les concentrations en azote étaient toujours, soit de 1 meq/l, soit de 2 meq/l.

Selon les expériences réalisées, le milieu était réparti à raison de 10 ou 50 ml dans des fioles à diverticule construites suivant le modèle préconisé par WIAME et STORCK (38) permettant de suivre facilement la croissance par turbidimétrie, ou de 300 ml dans des erlens de 4 litres, lorsqu'une importante quantité de cellules de levure était nécessaire.

La stérilisation du milieu se fait par filtration au moment de la répartition dans les flacons de culture, sur des membranes Millipore (diamètre des pores : 0,22 μ).

MILIEU POUR LES TESTS D'ASSIMILATION DE L'AZOTE

(milieu de Wickerhamm) (39)

* * * * *

<u>Source de carbone</u> pour	1 l	<u>Oligo éléments</u>	pour 1 l.
glucose	4,5 g	Acide borique	500 μ g
<u>Vitamines</u>		Sulfate de Cuivre	40 μ g
Biotine	2 μ g	Iodure de K	100 μ g
Panthoténate de Ca	400 μ g	Chlorure ferrique	200 μ g
Acide follique	2 μ g	Sulfate de manganèse	400 μ g
Inositol	2000 μ g	Molybdate de Na	200 μ g
Acide nicotinique	400 μ g	Sulfate de Zn	400 μ g
Acide β amino benzoïque	200 μ g	<u>Sels</u>	
Chlorhydrate de Pyridoxine	400 μ g	K H ₂ P O ₄	1 g
Riboflavine	200 μ g	Mg SO ₄	0,5 g
Chlorhydrate de Thiamine	400 μ g	Na Cl	0,1 g
		Ca Cl ₂	0,1 g

T A B L E A U I

2) Souche de levure utilisée

La souche de levure utilisée est la souche haploïde 264-4a, *Saccharomyces Cerevisiae* (de la collection de M. LUXBATH) dont les caractéristiques biochimiques sont proches de celles des levures de brasserie.

3) Conditions de culture

Avant chaque expérience, on fait une préculture de la souche sur le milieu au sulfate d'ammonium de façon à pouvoir commencer la culture expérimentale avec des cellules de levure se trouvant en phase exponentielle.

Le développement des cultures se fait en enceinte thermostatée à 28°C sous agitation constante.

En acrobatoire les fioles sont bouchées au coton et il a été vérifié que dans nos conditions de travail, l'aération n'était pas limitante.

L'aérobiose des cultures fut assurée par insufflation d'un courant continu d'azote N_2 après passage à travers un système stérilisant, dans les fioles de culture.

4) Contrôle de développement

La croissance des cultures est suivie sur un colorimètre Beckman par turbidimétrie. L'absorption est mesurée à 600 mμ dans les fioles de WILHE & STORCK (38) qu'il suffit de retourner pour introduire le cuvet dans la chambre du photomètre. Des courbes d'étalonnage permettent de convertir les transmissions en nombre de cellules par ml, ou ce qui est plus rigoureux en poids sec par unité de volume ($\mu g/ml$).

B. Extraction des acides aminés (Schéma IV)

Les acides aminés de la levure se répartissent en 3 groupes

- les acides aminés excrétés dans le milieu.
- les acides aminés du pool.
- les acides aminés constitutifs des protéines.

Les premiers sont facilement séparés par centrifugation du milieu, le surnageant contenant ces amino-acides.

Les acides aminés du pool, c'est-à-dire ceux se trouvant libres au sein de la cellule de levure furent extraits selon la méthode décrite par SIMS et FOLKES (27).

Le milieu de culture est filtré sur millipore (25 mm, 3 μ) lavé au Ringer glacé et la membrane est congelée par addition d'un peu de neige carbonique. On ajoute 40 ml d'ethanol absolu glacé et les levures peuvent être conservées ainsi un certain temps au congélateur. Les acides aminés libres sont extraits de la levure fixée en ajustant le contenu en alcool à 60 % et en portant le volume à 80 ml avec de l'ethanol à 60 %. Après 30 minutes, la solution est centrifugée et le résidu lavé deux fois avec 80 ml d'ethanol à 60 % et une troisième fois avec 80 ml d'acide chlorhydrique N/10 chaud. Les différents extraits sont rassemblés et après concentration, utilisés pour analyser le pool des amino-acides.

Les culots de centrifugation contenant les débris cellulaires sont alors repris dans 200 ml d'HCl 6 N afin d'hydrolyser les protéines, par ébullition sous reflux (27) pendant 24 heures.

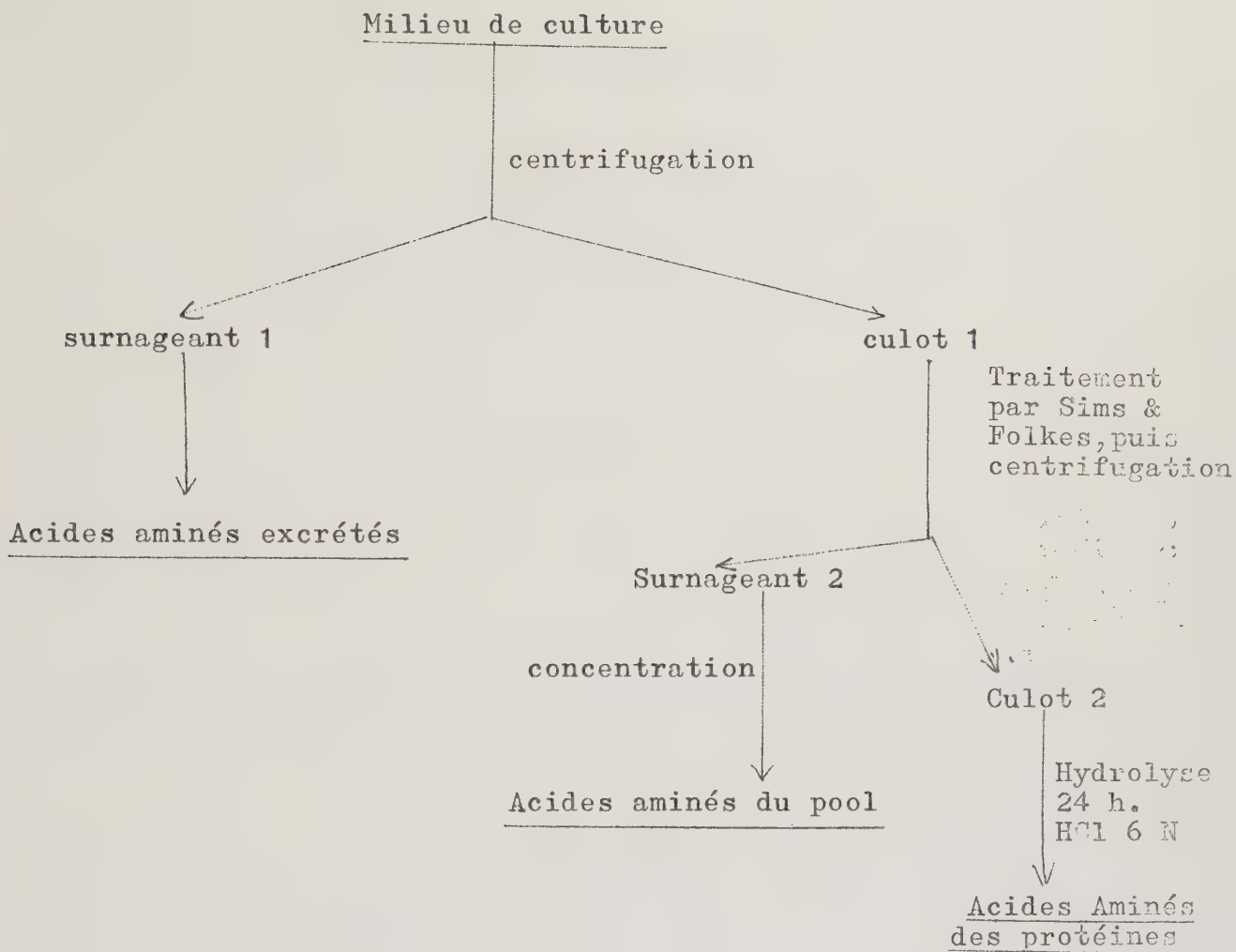
C. Dosage des acides aminés

La méthode employée et décrite ci-dessous est celle conseillée par les Etablissements TECHNICON (32).

Le dosage des acides aminés par chromatographie sur résine échangeuse d'ions est réalisé à l'aide d'un Analyseur automatique (Auto-Analyzer Technicon), basé sur les principes décrits par SPACKMAN, MOORE et STEIN (28). Il s'agit d'une résine cationique sulfonée à 8 % de divinyl-benzène, chromobead type A (21 μ).

On utilise une seule colonne de 140 cm x 6 mm pour un temps d'élution de 21 h.30 dans une enceinte thermostatée à 60°C. Le débit est de 30 ml par heure.

La phase mobile est constituée par une solution tampon à gradient de pH obtenu dans un autograd. Le pH est de 2,8 en début d'analyse pour arriver à 5 en fin de chromatographie.



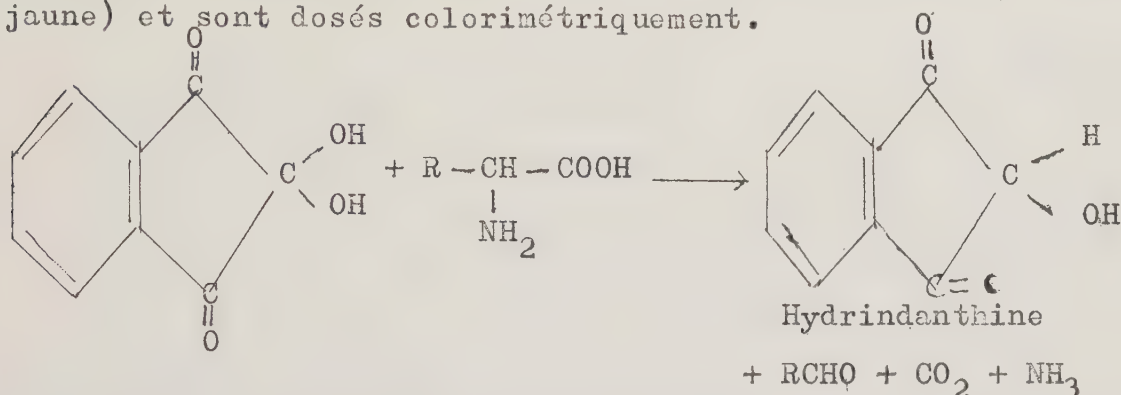
SCHEMA IV

Séparation des différentes fractions d'acides aminés lors des
cultures de levures.

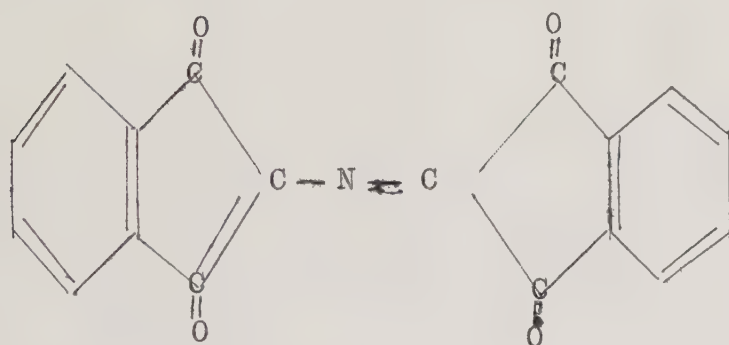
Après séparation, l'effluent est mélangé au réactif à la Ninhydrine pour donner un complexe coloré après stationnement à 95°C pendant 12 minutes.

Tous les acides aminés donnent un complexe violet ayant un maximum d'absorption à 570m μ sauf la proline et l'hydroxy proline (α iminés) dont le maximum se trouve à 440m μ (complexe jaune) et sont dosés colorimétriquement.

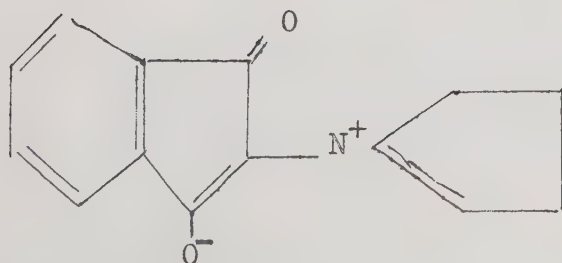
drine



L'ammoniac formé réagit avec la ninhydrine et sa forme réduite pour donner le complexe violet.



La proline, elle, donne le complexe jaune suivant :



666

R

D. Dosage particulier de la proline

1) Méthode chimique de WREN & WIGGALL (40)

Dans la solution contenant la proline et d'autres produits aminés on ajoute de l'acide formique (0,1 ml/mg d'acides aminés) et de l'eau oxygénée (0,002 ml/mg) . Après une heure le mélange est évaporé à sec dans un courant d'air chaud (l'acide formique résiduel pouvant causer une réaction explosive lors des étapes ultérieures). Le résidu est dissout dans un volume d'eau tel, que l'on ait entre 3 et 30 μg de proline par ml.

Pour enlever les acides aminés basiques, un échantillon de 2 ml est ajouté à 200 ± 20 mg de Permutite (Amberlite C.G. 50, type II , 200/400 mesh) dans un tube et secoué fréquemment durant quinze minutes . Après une centrifugation rapide, 1 ml du surnageant est porté pour analyse dans un tube pyrex de 20 ml.

On y ajoute 2,5 ml. d'une solution de glyocolle (4 μ moles/ml dans un mélange d'acide acétique et d'acide phosphorique 6 M 3/2 v/v) et 2,5 ml d'une solution de Ninhydrine (40 mg/ml dans l'acide acétique); le tube est

The first of these is the fact that the
the second is the fact that the
the third is the fact that the

the fourth is the fact that the
the fifth is the fact that the
the sixth is the fact that the

the seventh is the fact that the
the eighth is the fact that the
the ninth is the fact that the

the tenth is the fact that the
the eleventh is the fact that the
the twelfth is the fact that the

the thirteenth is the fact that the
the fourteenth is the fact that the
the fifteenth is the fact that the

the sixteenth is the fact that the
the seventeenth is the fact that the
the eighteenth is the fact that the

Densité optique
à 515 m μ

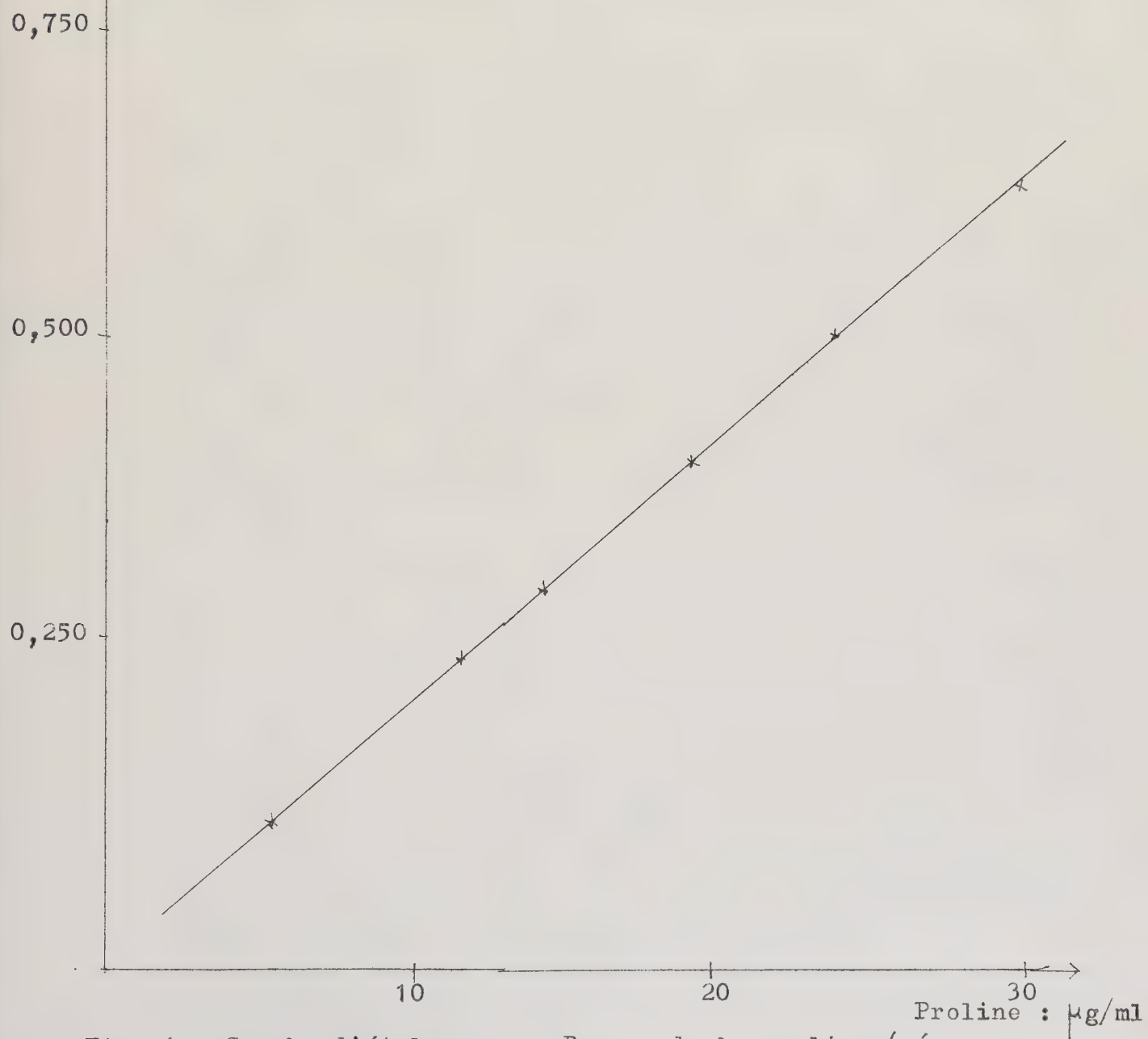


Fig. 1 : Courbe d'étalonnage - Dosage de la proline (méthode chimique).

secoué, bouché et placé dans un bain-marie à $95^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durant 40 minutes. Après refroidissement, la solution est extraite avec 5 ml de benzène et centrifugée pour clarifier la couche de benzène. L'extinction de cette couche est mesurée à 515 m μ à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman D.B.G.

Une courbe étalon a été tracée qui nous donne la proline en $\mu\text{g/ml}$ en fonction de la densité optique à 515 m μ (fig.1)

2) Etude de la pénétration dans la cellule de la ^{14}C Proline

La proline marquée nous a été fournie par le C.E.A. : ^{14}C Proline en solution dans HCl 0,01 N. Il suffit d'ajouter à la proline normale un peu de proline marquée en quantité connue dans les fioles de culture.

Pour ne pas utiliser de quantités trop importantes de proline ^{14}C lors de l'étude de la pénétration de la proline dans la cellule de levure, nous avons procédé de la manière suivante : lorsque le poids sec d'une pré-culture atteint 200 à 300 $\mu\text{g/ml}$, celle-ci est centrifugée, lavée au Ringer et remise en suspension dans le même milieu à la concentration 10/9, à 200 $\mu\text{g/ml}$. 9 ml d'une telle suspension sont introduits dans une fiole de Wiame et Storck et l'on y ajoute au temps zéro :

0,5 ml de ^{14}C proline (0,005 m C) ce qui représente 0,1 μM de proline dans 10 ml.

0,5 ml d'une solution de proline telle que dans les 10 ml de suspension finale, on ait 4 $\mu\text{M/ml}$.

Lorsque les expériences sont effectuées avec des levures cultivées sur moût de brasserie, on ajoute 1 ml de ^{14}C proline (0,01 m C) à 20 ml de moût, celui-ci contenant assez de proline pour qu'il ne soit pas nécessaire d'ajouter de la proline non marquée. Dans tous les cas, on suit la multiplication cellulaire dans des fioles identiques.

Pour bloquer la synthèse protéique nous avons employé de l'actidione (26) (1 ml à 21 mg/l) une incubation préalable de 5 minutes étant effectuée avant l'addition de ^{14}C proline.

Au moment désiré, une aliquote de la culture est prélevée, filtrée sur membrane millipore (diamètre 25 mm, pores $0,45\mu$.), lavée à l'eau distillée glacée et desséchée vers 50° sur une coupelle et introduite dans la chambre d'un compteur de particules SAIP :spectromètre à un canal à transistors, type SPM 3 T.

La couche est suffisamment mince pour que les résultats ne soient influencés par des phénomènes de self absorption.

Le rapport de l'activité de l'échantillon recueilli sur l'activité totale introduite déterminée sur un échantillon de culture non filtré donne la proportion de proline qui a pénétré à l'intérieur de la cellule de levure. (Pour avoir une précision correcte, il fallait compter par échantillon 1000 coups environ).

E. Dosage de l'Ammonium

Pour mesurer la disparition de l'azote du milieu, lorsque celui-ci se trouve sous la forme d'ions ammonium, la méthode utilisée est celle de Kjeldahl.

F. Dosage de la Proline Oxydase

Le schéma III nous montre que chez les mammifères, ainsi que chez les bactéries, la L proline est dégradée en acide Δ_4 pyrroline 5 carboxylique dans certaines conditions par l'intermédiaire de la proline-oxydase. Nous avons étudié celle-ci chez *Saccharomyces Cerevisiae* en employant la méthode décrite par de HAUWER, LAVALLE et WIAME (12). L'activité de cette enzyme se mesure sur des cellules entières dans un appareil de Warburg. Les cellules de levure récoltées en phase exponentielle de croissance sont centrifugées, lavées dans du tampon triéthanolamine (5×10^{-2} M pH 7,5) et remises en suspension dans ce tampon. 1,6 ml de la suspension

de levure (2,00 mg de levure) et 15 μ moles de L proline dans 0,4 ml d'eau sont placés dans chaque fiole manométrique. La consommation d'oxygène est mesurée à 28°C. La phase gazeuse est de l'air et la cupule centrale contient 0,2 ml de NaOH à 20 %.

L'inhibiteur utilisé dans certaines expériences est de l'Antimycine A (18) (0,8 μ g/g levure).

Le contrôle de l'effet de cet inhibiteur sur la respiration est effectué en remplaçant la L proline par 15 μ moles de glucose.

R E S U L T A T S OBTENUS AU COURS DE NOS RECHERCHES

Dans un premier temps, nous avons recherché, par des méthodes générales, des informations concernant le comportement de la levure en présence de proline. Cette étude nous a permis de préciser le problème et de déterminer les expériences nécessaires pour le résoudre.

A. Etude du comportement de la levure vis-à-vis de la proline

Ces informations concernent la croissance de la levure avec différentes sources azotées, la disparition de la source azotée (proline et sulfate d'ammonium) du milieu, les concentrations intracellulaires d'acides aminés, notamment le pool de la proline.

1) Croissance :

Il est intéressant de travailler sur une souche bien déterminée ; ceci implique en premier lieu de voir si son comportement est analogue à celui des souches de levure de brasserie. D'où un certain nombre d'études de croissance que nous avons effectuées sur notre souche 264-2 B en fonction de différents paramètres : aération, source d'azote : fig. 2 à 5.

Nous constatons tout d'abord qu'en aérobiose, pour une quantité équivalente d'azote (2 m. équivalents), les courbes de croissance de la 264-2 B sont voisines sur sulfate et sur proline, le taux de croissance étant légèrement plus élevé avec le sulfate qu'avec la proline, mais la phase exponentielle de croissance étant plus longue et le poids sec recueilli en fin de culture plus important avec la proline. Notons que le rôle de source carbonée de la proline n'est pas en cause puisque c'est l'azote qui limite le rendement dans nos conditions de travail.

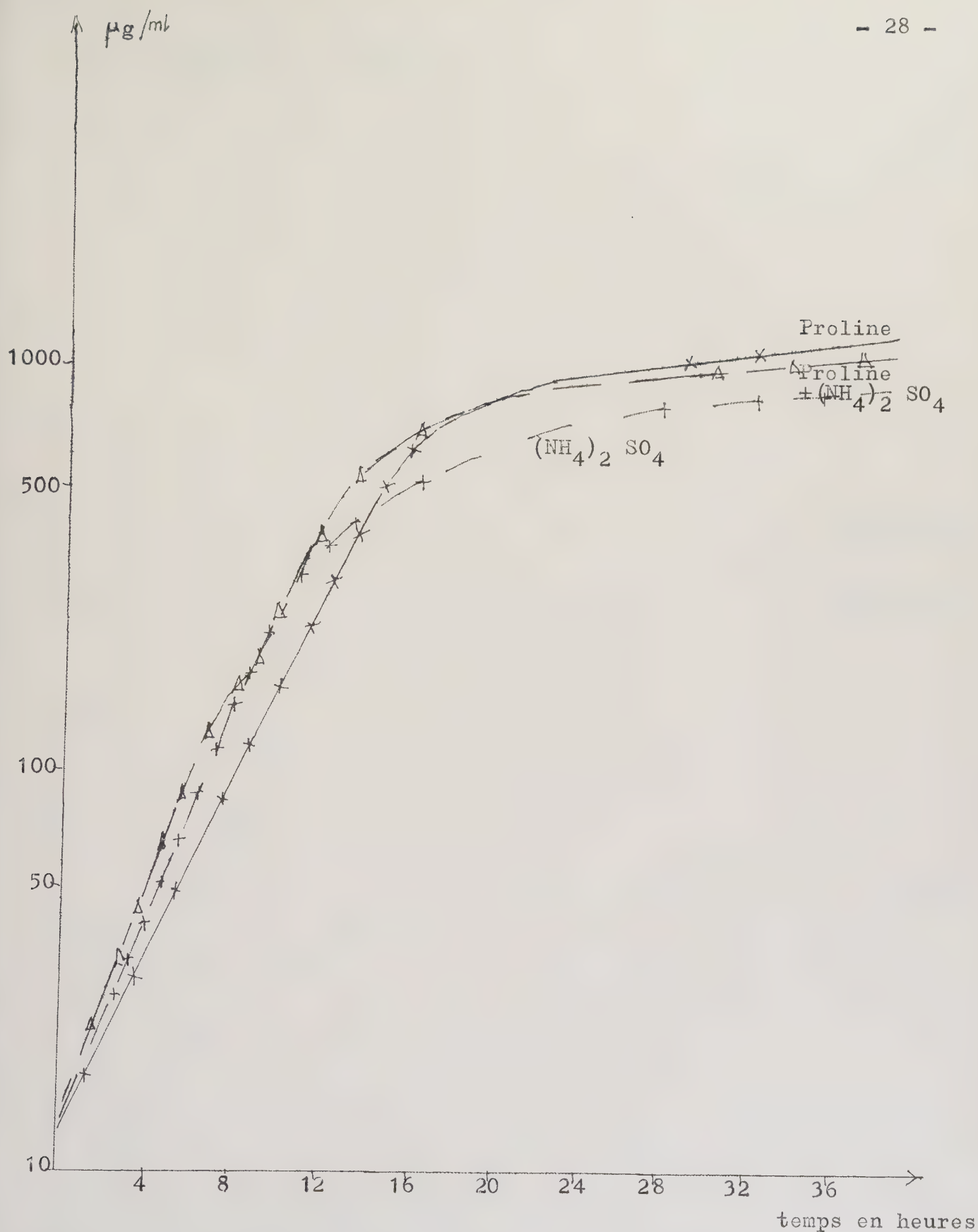


Fig. 2 : Courbes de croissance de la souche 264-2-B.
Aerobiose - Glucose 25 meq - Azote 2 meq.

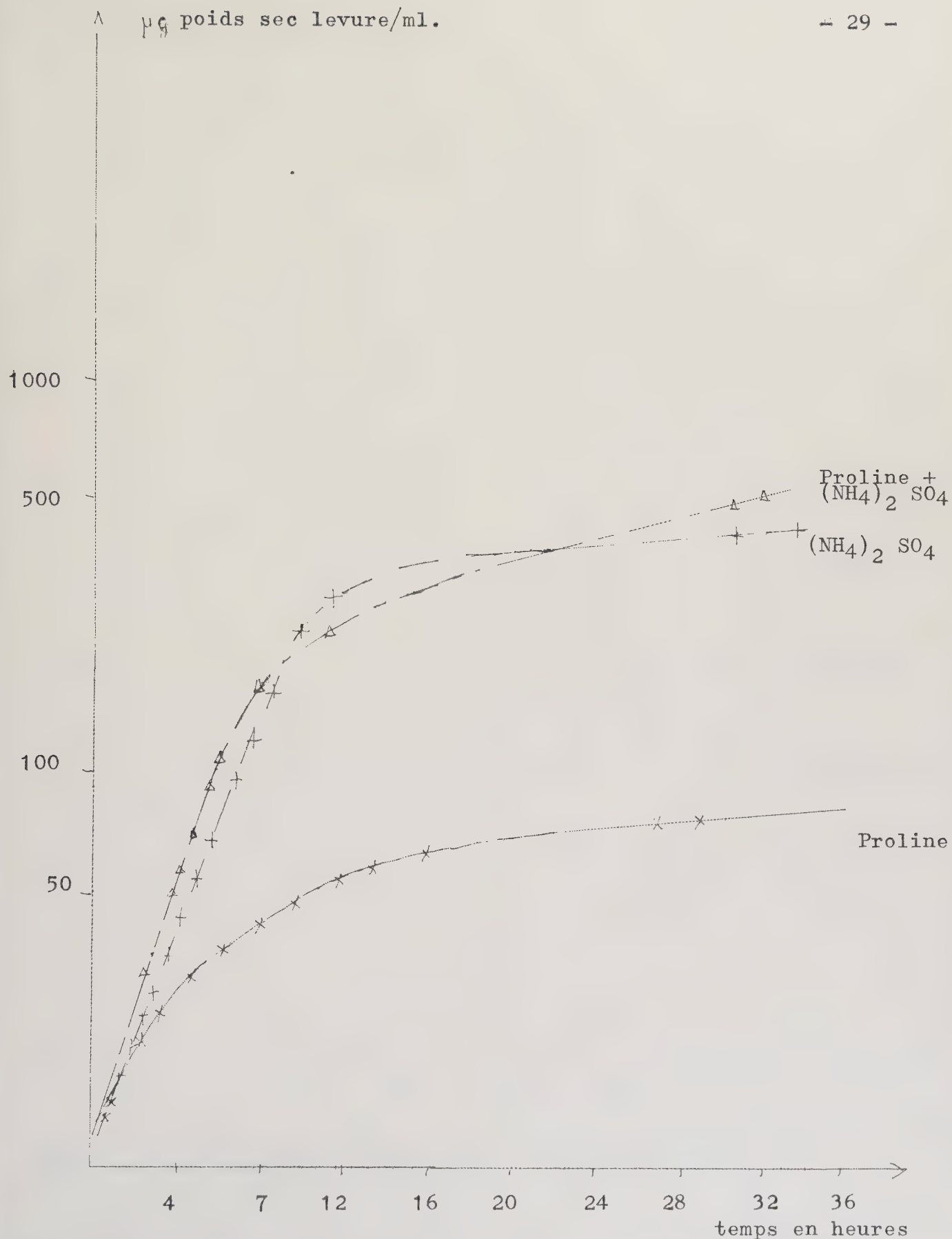


Fig. 3 - Courbes de croissance de la souche 264 2- B - Anaérobiose -
Glucose 25 meq - Azote 2 meq -

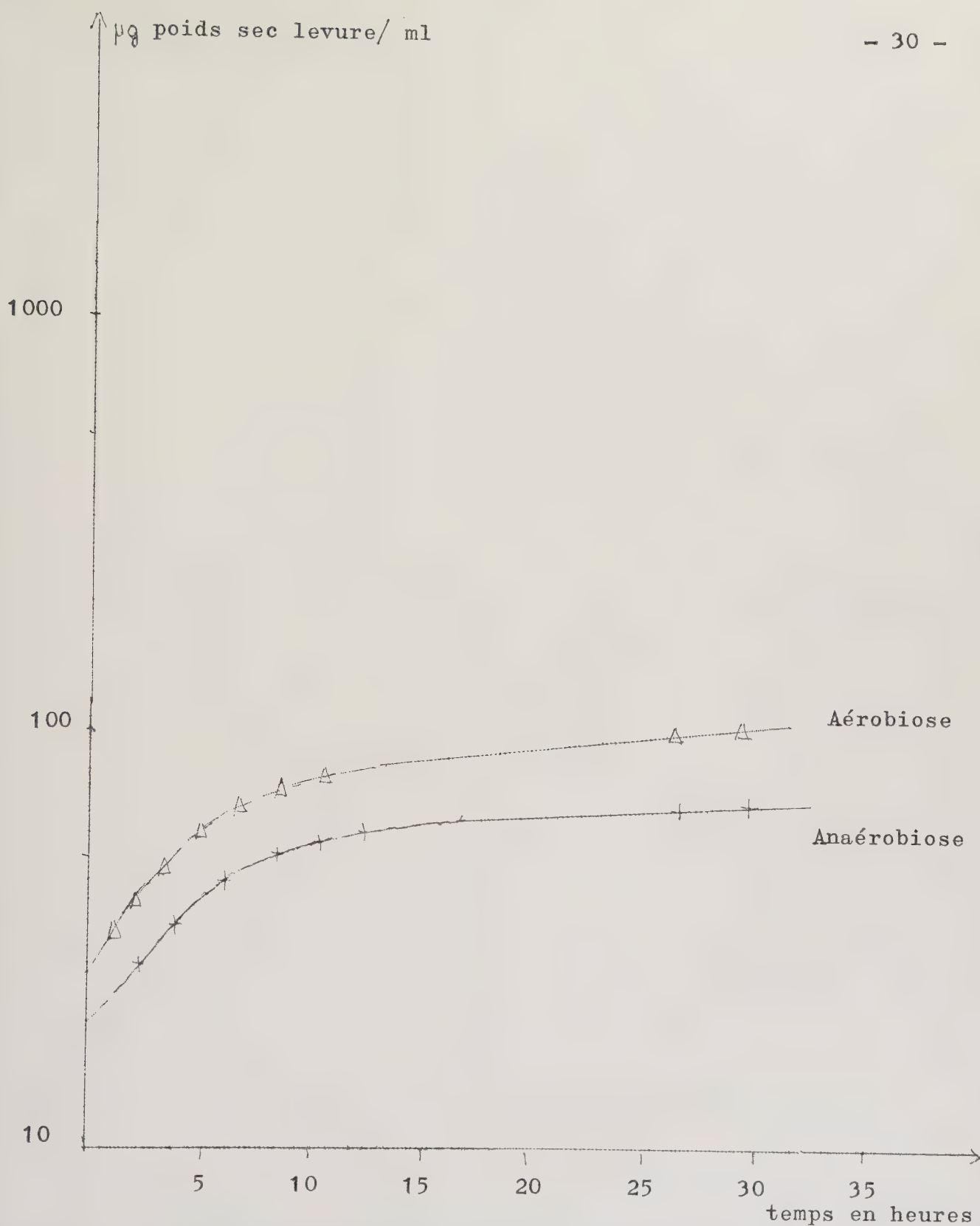


Fig. 4 - Courbes de croissance de la souche 264-2-B sur
Hydroxy proline 2 meq , Glucose 25 meq -

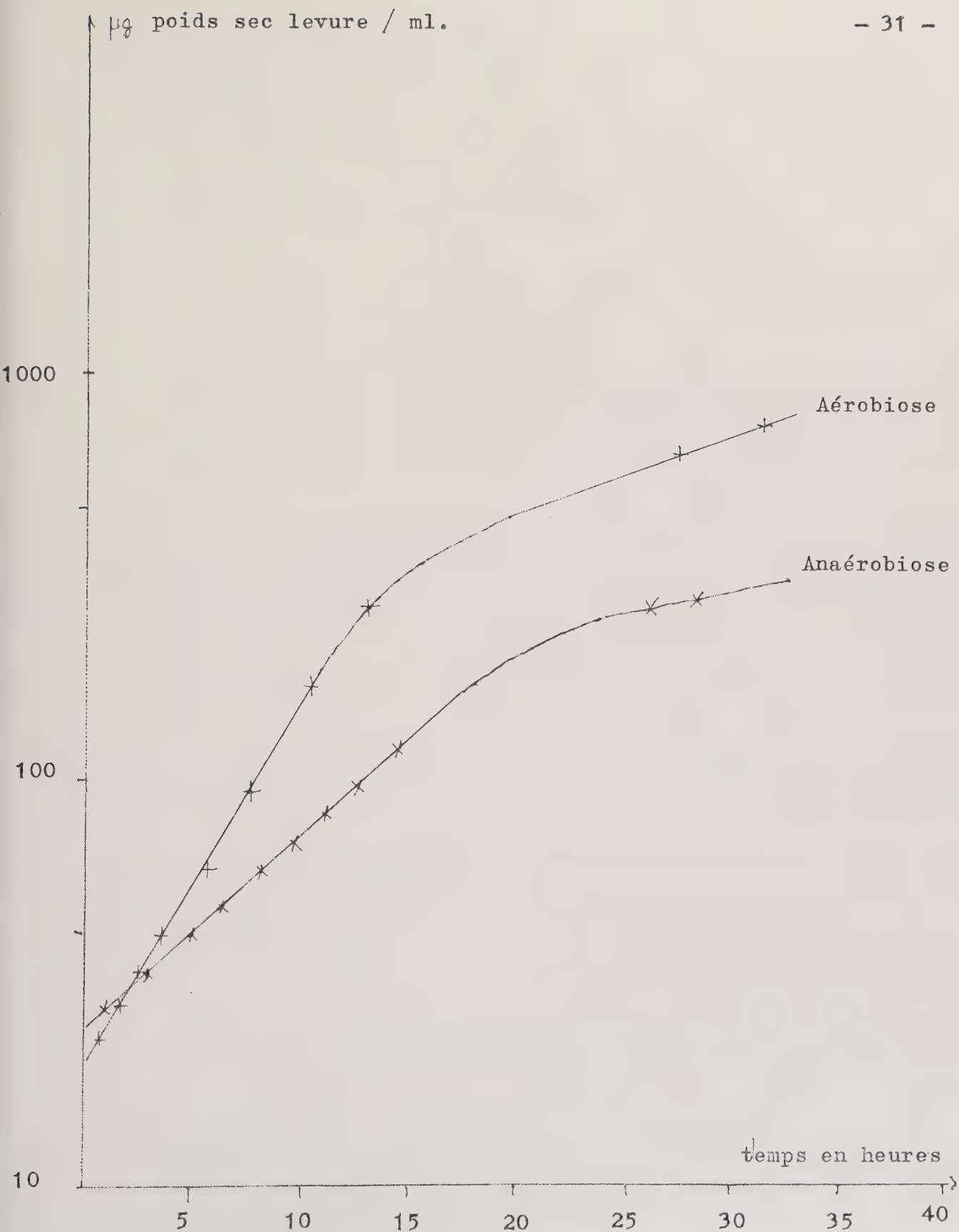


fig. 5 - Courbes de croissance de la souche 264-2-B sur Ornithine 2 meq - Glucose 25 meq -

• • • • •

• • • • •

• • • • •

• • • • •

• • • • •

• • • • •

• • • • •

• • • • •

• • • • •

• • • • •

• • • • •

• • • • •

• • • • •

La courbe de croissance de notre souche sur sulfate d'ammonium plus proline (2 m.équivalents d'azote) (fig. 2) présente un léger décrochement qui correspond probablement à la fin de l'utilisation du sulfate (phénomène de diauxie). Le poids sec recueilli est intermédiaire entre ceux obtenus lors des cultures sur sulfate seul ou proline seule.

Au cours des cultures en anaérobiose, sous azote stérile, nous constatons tout d'abord que le poids sec recueilli est toujours nettement inférieur. De plus, avec la proline comme unique source azotée, la croissance est pratiquement nulle, la levure se développant seulement pendant quelques temps, grâce à ses réserves : la courbe est, en effet, analogue à celle d'une croissance sur un milieu sans azote (4).

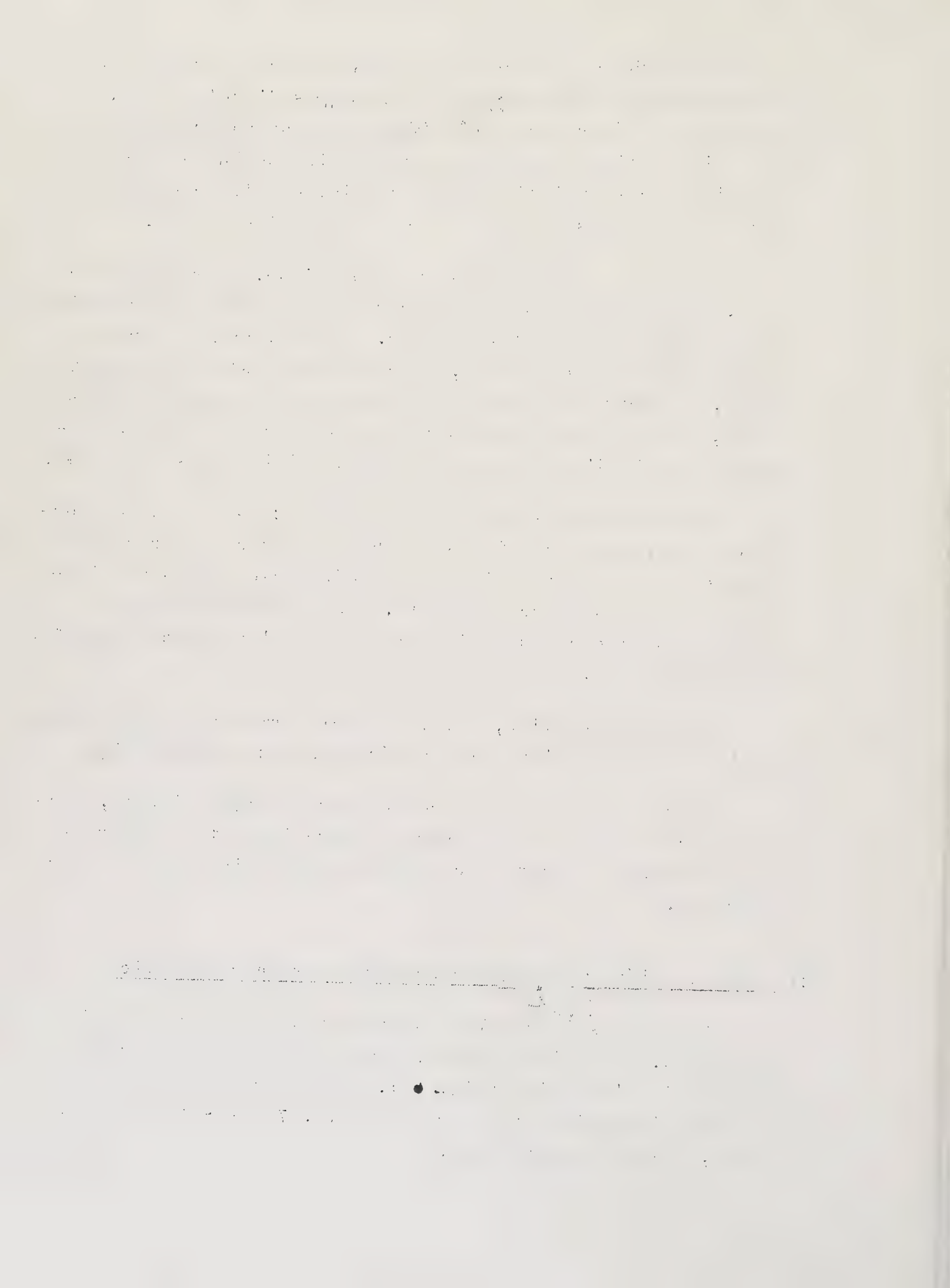
Nous constatons donc que la souche 264-2 B a un comportement analogue à celui des souches de levure de brasserie envers la proline : croissance en aérobiose, après utilisation des autres sources d'azote, pas de développement en anaérobiose ; ceci justifie notre choix d'une souche haploïde bien déterminée.

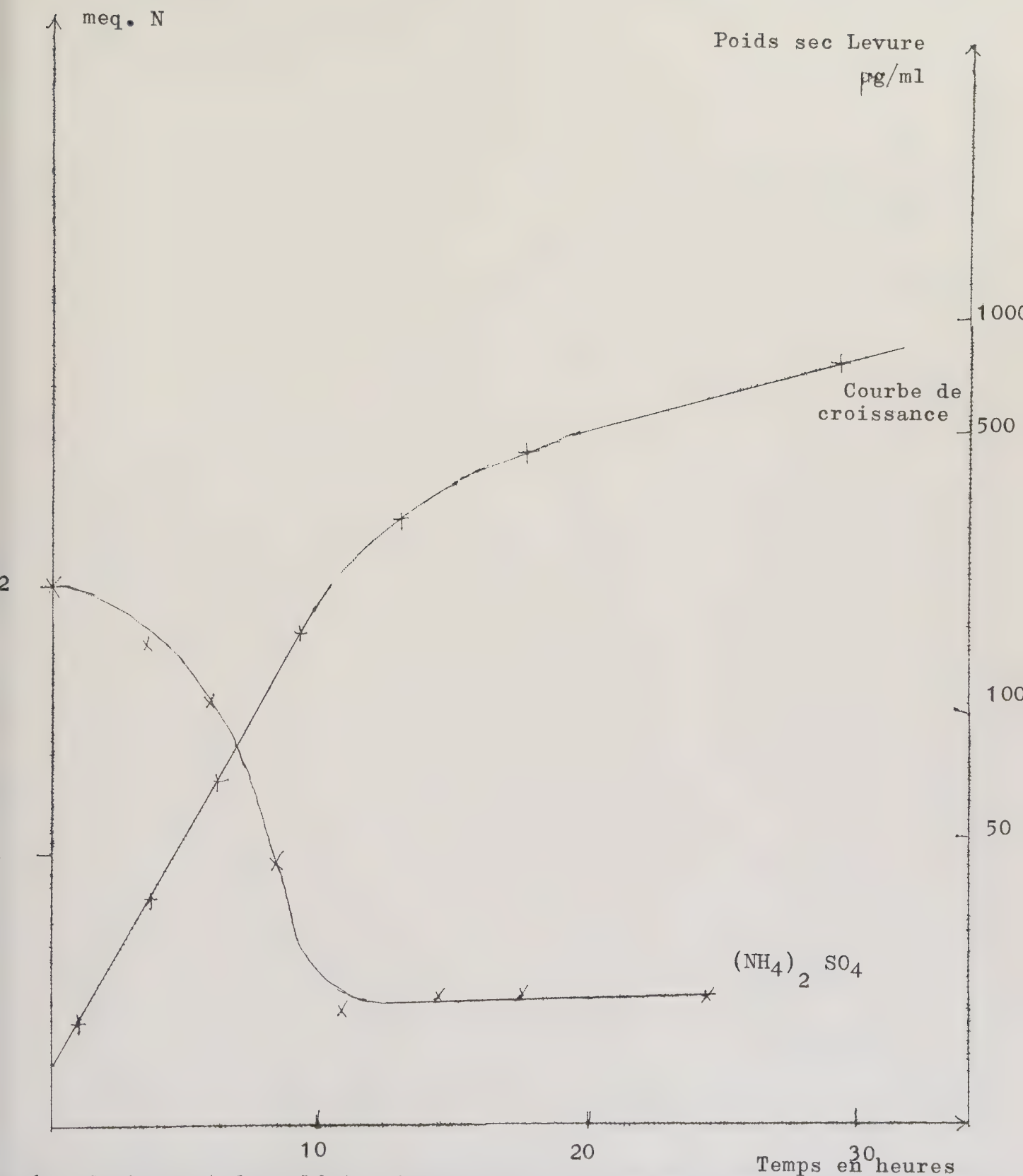
L'hydroxy proline, elle, ne peut permettre la croissance de la levure que l'on soit en aérobiose ou en anaérobiose.

L'ornithine, utilisée comme source unique d'azote, permet la croissance de la levure en aérobiose et en anaérobiose, mais avec un taux de croissance plus faible dans ce dernier cas.

2) Etude de l'évolution des concentrations dans le milieu :

Nous avons mesuré la disparition de la source azotée du milieu, tout d'abord avec, comme seule source d'azote, du sulfate d'ammonium (fig. 6), puis avec un mélange de sulfate d'ammonium et de proline (fig. 7 et 8), en aérobiose, puis en anaérobiose.





g.6 - Epuisement du sulfate d'ammonium du milieu au cours de la croissance
Souche 264- 2 B - Aérobiose - Glucose 25 m M - $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 1 m M.

1786

1786

1786

1786

1786

1786

1786

1786

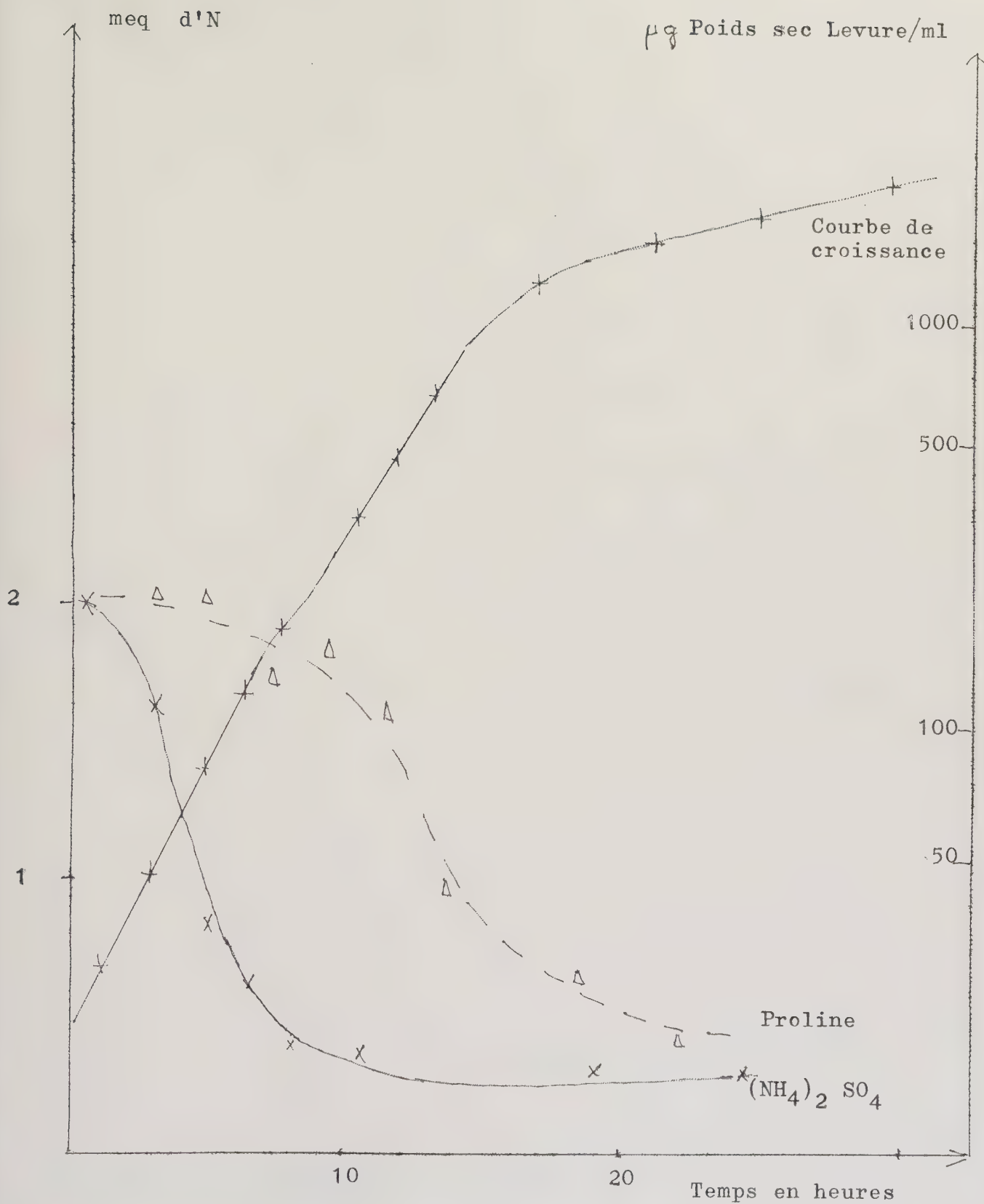
1786

1786

1786

1786

1786



ig.7 - Epuisement du sulfate d'ammonium et de la proline du milieu au cours de la croissance Souche 264-2-B - Aérobiose. Glucose 55 m M
Proline 1 m M - SO₄ (NH₄)₂ 1 m M -

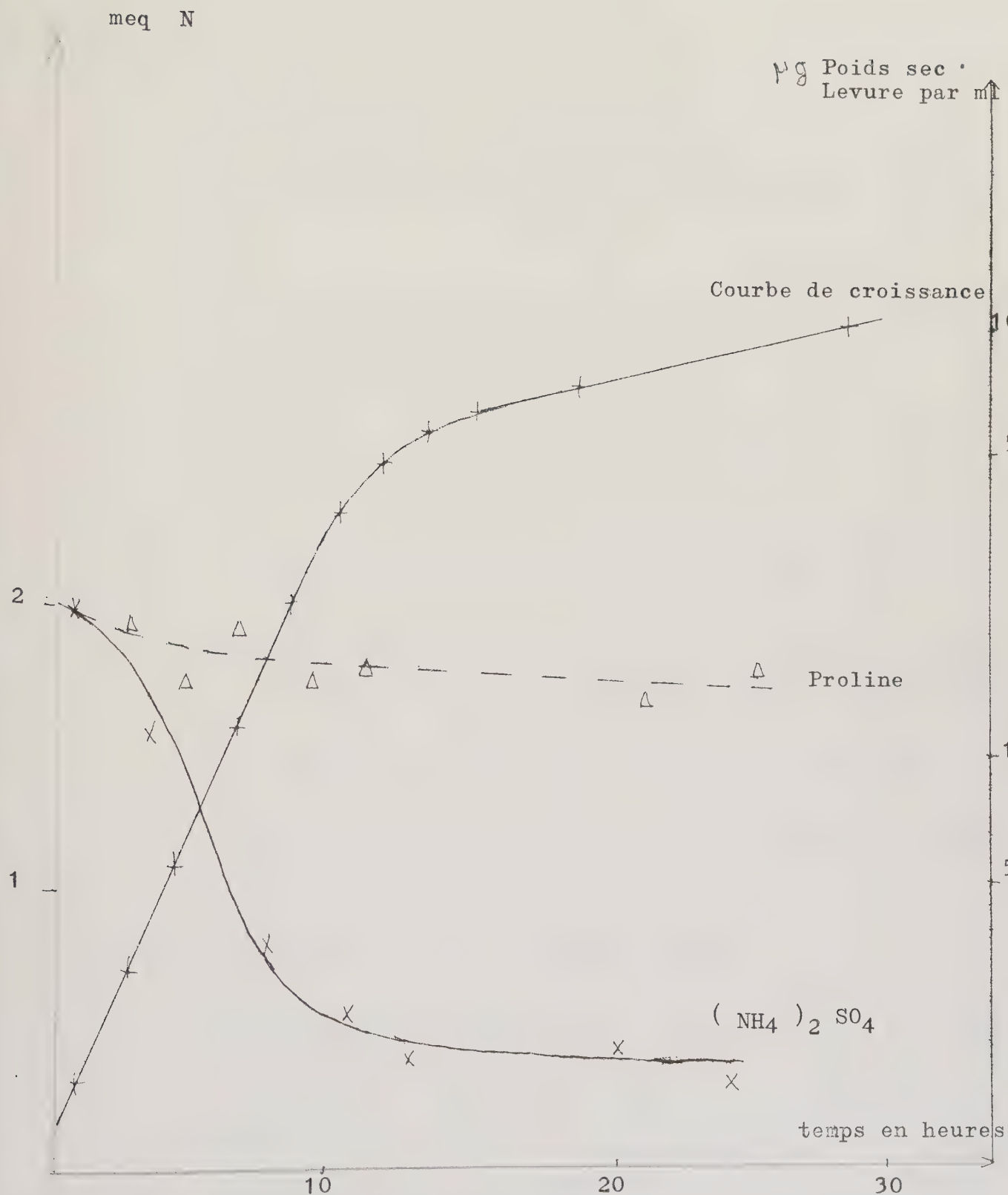


Fig. 8 - Epuisement du sulfate d'ammonium et de la proline du milieu au cours de la croissance (souche 264-2-B) Anaérobiose
Glucose 55 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 mM
Proline 1 mM

La fig. 7 met bien en évidence le fait que la proline n'est pratiquement utilisée par la levure, que lorsque l'autre source azotée, le sulfate d'ammonium, a disparu. Ceci est donc en accord avec ce qui se passe lors des fermentations hautes effectuées en laboratoire où la proline est assimilée seulement lorsque toutes les autres sources azotées ont disparu.

JONES et PIERCE (14) ont d'autre part classé les acides aminés d'un moult en se basant sur l'ordre de départ des acides aminés du milieu, en 4 groupes :

- groupe A : acides aminés immédiatement absorbés (acide glutamique),
- groupe B : acides aminés graduellement absorbés au cours de la fermentation (ex : valine),
- groupe C : acides aminés assimilés après un certain temps de latence (ex : glycine, sulfate d'ammonium),
- groupe D : acides aminés non absorbés (proline).

Nos travaux sont donc en accord avec les résultats obtenus par JONES et PIERCE.

3) Etude des concentrations intracellulaires :

- a) Pool des amino-acides : nous avons effectué cette analyse dans différentes conditions de culture (culture sur proline ou sur sulfate d'ammonium en aérobiose ou anaérobiose) pour voir comment varient les concentrations en amino-acides, en particulier, celle des acides aminés ayant des relations avec la proline : acide glutamique, ornithine, arginine.

Ces analyses furent effectuées en phase exponentielle (T : 76) sauf pour la culture sur proline en anaérobiose,

puisque dans ces conditions, la croissance n'est jamais exponentielle et la transmission 76 % n'est jamais atteinte. Dans ce dernier cas, nous avons fait notre prélèvement au bout du temps nécessaire aux autres cultures pour atteindre la valeur 76 en transmission.

Le tableau II exprimant les résultats du pool d'acide aminé nous montre que la proline, pratiquement absente lors des cultures sur sulfate, se trouve en quantité importante lors des cultures sur proline. Cela est normal en aérobiose, puisque l'on sait que notre souche utilise la proline. Par contre, en anaérobiose, nous en retrouvons des quantités encore plus importantes.

Lors de ces mêmes cultures sur proline, l'acide glutamique est en quantité très importante en aérobiose, alors qu'en anaérobiose, il y en a à peu près six fois moins. Or, si l'on se réfère au schéma III, on voit que le catabolisme de la proline peut mener à l'acide glutamique.

Résultats exprimés en micromoles par gramme de poids sec de levure.

	SO ₄ =aero	SO ₄ =anaero	Pro. aero	Pro. anaero
A. Aspartique	22,3	22,3	9,2	10,2
Thréonine	12,9	16,4	6,4	6,9
Sérine	22,3	19,2	11,6	26,0
A. Glutamique	70,0	91,3	149,7	33,1
Proline	traces	traces	61,9	234,2
Glycine	20,0	12,5	12,6	16,4
Alanine	16,5	15,7	9,0	9,1
Valine	4,3	3,5	1,8	3,8
Cystine	1,5	0,6	2,6	2,4
Méthionine	0,6	0,4	0	0
Isoleucine	2,3	1,8	1,3	1,8
Leucine	2,1	1,3	1,2	1,8
Tyrosine	1,5	1,4	0	2,2
Phénylalanine	0,9	1,3	0	0,9
Ammoniac	96,0	94,6	101,9	14,7
Ornithine	4,9	5,2	10,2	10,9
Lysine	53,5	22,6	18,1	14,2
Histidine	5,8	6,8	2,0	3,3
Arginine	46,6	64,6	7,4	2,2

Tableau II : Pool des amino-acides.

The first part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $f(x)$ defined by the equation $f(x) = \int_0^x f(t) dt$. It is shown that $f(x)$ is a constant function, and its value is determined by the initial condition $f(0) = 1$. The second part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $g(x)$ defined by the equation $g(x) = \int_0^x g(t) dt$. It is shown that $g(x)$ is a constant function, and its value is determined by the initial condition $g(0) = 1$. The third part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $h(x)$ defined by the equation $h(x) = \int_0^x h(t) dt$. It is shown that $h(x)$ is a constant function, and its value is determined by the initial condition $h(0) = 1$.

The fourth part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $i(x)$ defined by the equation $i(x) = \int_0^x i(t) dt$. It is shown that $i(x)$ is a constant function, and its value is determined by the initial condition $i(0) = 1$. The fifth part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $j(x)$ defined by the equation $j(x) = \int_0^x j(t) dt$. It is shown that $j(x)$ is a constant function, and its value is determined by the initial condition $j(0) = 1$. The sixth part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $k(x)$ defined by the equation $k(x) = \int_0^x k(t) dt$. It is shown that $k(x)$ is a constant function, and its value is determined by the initial condition $k(0) = 1$. The seventh part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $l(x)$ defined by the equation $l(x) = \int_0^x l(t) dt$. It is shown that $l(x)$ is a constant function, and its value is determined by the initial condition $l(0) = 1$. The eighth part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $m(x)$ defined by the equation $m(x) = \int_0^x m(t) dt$. It is shown that $m(x)$ is a constant function, and its value is determined by the initial condition $m(0) = 1$. The ninth part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $n(x)$ defined by the equation $n(x) = \int_0^x n(t) dt$. It is shown that $n(x)$ is a constant function, and its value is determined by the initial condition $n(0) = 1$. The tenth part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $o(x)$ defined by the equation $o(x) = \int_0^x o(t) dt$. It is shown that $o(x)$ is a constant function, and its value is determined by the initial condition $o(0) = 1$.

Cette importante quantité d'acide glutamique provient de la dégradation de la proline en aérobiose, alors qu'en anaérobiose, celle-ci ne serait pas dégradée. Cette expérience est donc en faveur d'un blocage du catabolisme de la proline par l'anaérobiose.

Notons également les quantités d'ammoniac très faibles lors des cultures sur sulfate et sur proline en aérobiose, alors qu'avec cette dernière source azotée en anaérobiose on en a très peu. L'arginine est en quantité importante sur sulfate et faible sur proline ; le faible taux d'arginine en présence de proline est sans doute en rapport avec un effet d'induction de la proline sur l'enzyme analogue à celui mis en évidence par LAISHELM et BOLLING chez *Bacillus Licheniformis* ; de toute façon, ce faible taux d'arginine, puisqu'il s'observe aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose, n'a pas d'incidence sur le phénomène étudié.

Le comportement des autres acides aminés ne présente rien d'intérêt spécial pour notre travail, puisqu'il n'y a pas de rapport avec les voies cataboliques de la proline.

Parallèlement à cette étude, nous avons pu constater que la constitution des protéines ne variait pratiquement pas en fonction de la source azotée, ce qui est en accord avec les travaux de BLOCK et BOLLING (3), qui arrivent à la conclusion que la protéine de levure avait une composition constante en acides aminés en fonction des conditions de culture, mais en désaccord avec les travaux de LAFON et LAFON-FAURCADE (24), qui ont montré que chez les levures de vin, les protéines avaient un spectre d'acide aminé variant avec la source azotée.

	SO ₄ ⁼	Proline		SO ₄ ⁼	Proline
A. aspartique	8,5	8,4	Méthionine	-	0,1
Thréonine	5,0	4,9	Isoleucine	4,1	4,2
Sérine	5,3	5,3	Leucine	6,4	6,6
A. glutamique	7,4	8,4	Tyrosine	2,2	2,8
Proline	2,3	3,3	Phénylalanine	2,7	3,0
Glycine	6,7	6,7	Lysine	17,0	14,3
Alanine	6,6	6,7	Histidine	4,3	4,7
Valine	6,0	5,5	Arginine	13,3	11,5
Cystine	0,3	0,4	Divers	2,3	3,2

Tableau III : Composition des protéines en acide aminé, en fonction de la source azotée, en aéro-biose. Résultats exprimés en % du total d'azote aminé.

- b) Evolution du pool de la proline lors de l'addition de proline dans le milieu pendant la croissance : l'analyse des pools d'acides aminés lors des cultures sur proline en aérobiose et anaérobiose démontre la présence de quantités plus importantes de proline dans la cellule en anaérobiose qu'en aérobiose.

Aussi, à partir de cultures sur sulfate d'ammonium en phase exponentielle, et après addition de proline, nous avons étudié l'évolution de celle-ci dans le pool. Au temps 0, nous avons ajouté dans le milieu une certaine quantité de proline et nous avons alors suivi dans le temps l'évolution du pool de cet acide aminé. Ces mesures furent effectuées en aérobiose et anaérobiose par dosage chimique.

La fig. 9 nous montre que le pool est un peu plus important en aérobiose qu'en anaérobiose, ce dernier semblant avoir tout de suite une valeur constante, alors qu'en aérobiose, il y a augmentation du pool de la proline durant les premières minutes.

μg Proline/mg poids sec de Levure

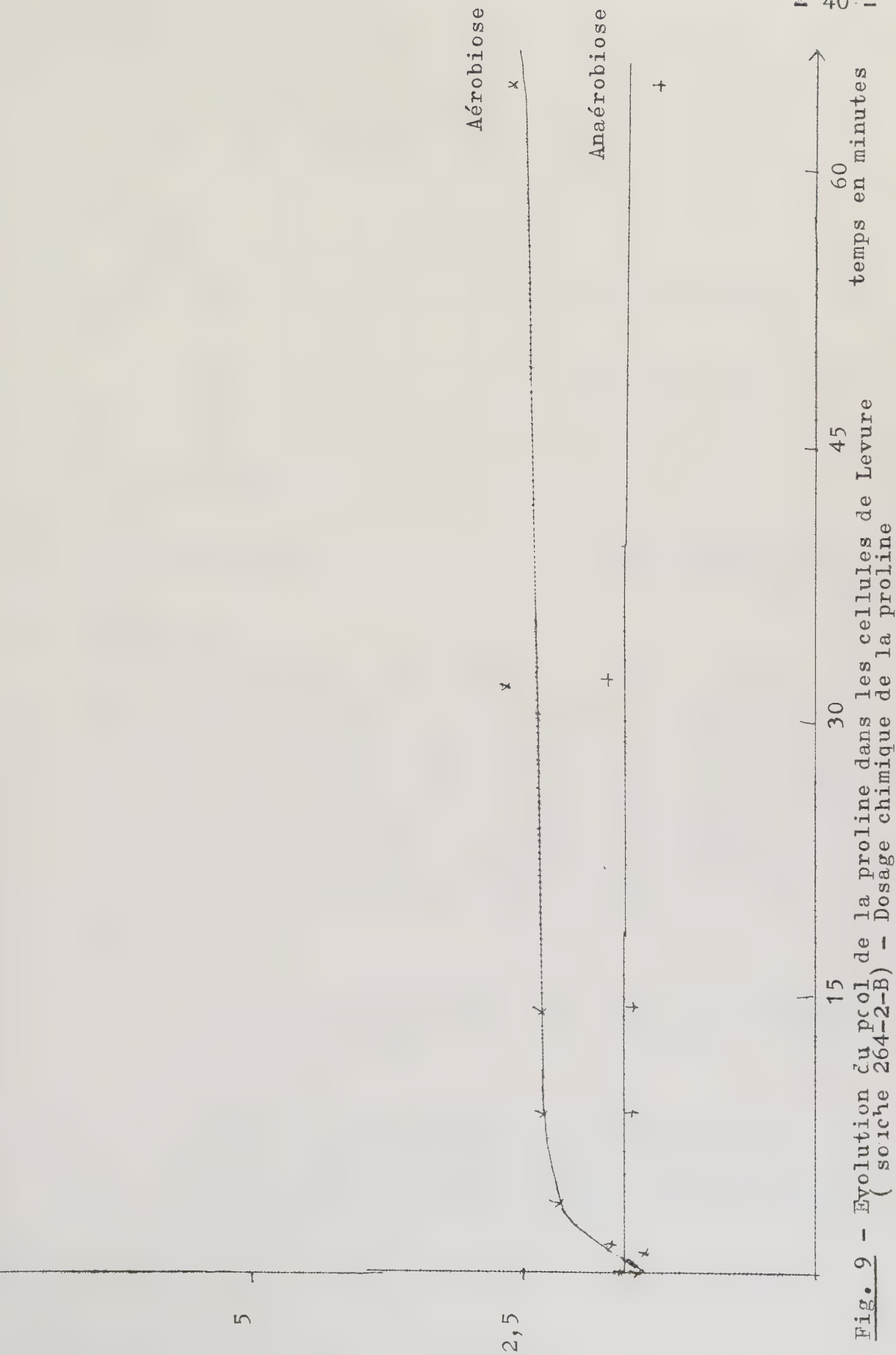


Fig. 9 - Evolution du pol de la proline dans les cellules de Levure (sorche 264-2-B) - Dosage chimique de la proline

Ces résultats peuvent paraître contradictoires avec les résultats des analyses Technicon, qui donnaient, pour la proline, un pool plus important en anaérobiose qu'en aérobie. Rappelons cependant que ces analyses étaient effectuées sur des levures cultivées sur proline, alors qu'ici, la proline est ajoutée à un milieu au sulfate d'ammonium.

D'autre part, il ne faut pas oublier que le pool de la proline est le résultat de deux phénomènes à effets opposés :

- l'entrée de proline et la biosynthèse éventuelle (probablement réprimée en présence de proline exogène),
- la dégradation.

Par conséquent, ces résultats sont peu significatifs.

Discussion :

D'après toutes ces expériences, il apparaît que la proline constitue une bonne source d'azote, après épuisement du sulfate d'ammonium lorsque celui-ci est présent, mais seulement en aérobie. Tous ces résultats sont d'ailleurs en accord avec les expériences effectuées par divers auteurs sur des levures de brasseries cultivées sur moût.

Pour expliquer ces variations du comportement de la levure vis-à-vis de la proline, deux hypothèses peuvent être avancées :

- l'oxygène serait indispensable à une réaction métabolique intervenant lors de la dégradation de ^{la} proline,
- l'oxygène serait nécessaire à la biosynthèse d'un système enzymatique ou perméasique réprimée par le sulfate d'ammonium et déréprimée après épuisement de ce dernier.

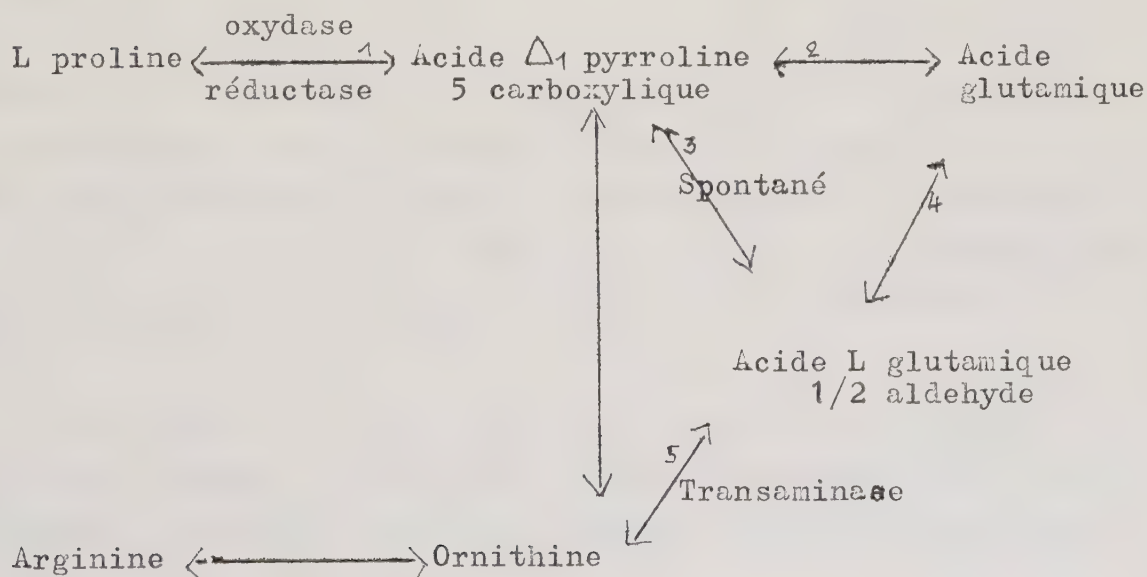
B. Etude du catabolisme de la proline

D'après les travaux cités dans la première partie, deux voies se présentent pour la dégradation de la proline :

- soit celle ayant pour première étape l'hydroxy proline,
- soit celle passant par l'acide Δ_1 pyrroline 5 carboxylique et donnant rapidement l'acide glutamique.

Nous avons montré que la levure ne pouvait utiliser l'hydroxy proline, que ce soit en aérobiose ou en anaérobiose (fig. 4). Donc la voie passant par l'hydroxy proline n'est pas celle de la dégradation de la proline.

L'acide glutamique résultant de la dégradation de la proline est donc formé probablement par la voie catabolique ayant pour première étape le Δ_1 pyrroline 5 carboxylate.



2. Pyrroline 5 carboxylate dehydrogénase

4. Aldéhyde dehydrogénase

Le schéma ci-dessus montre les voies menant de la proline à l'acide glutamique. Etant donné que l'ornithine permet la croissance en anaérobiose comme en aérobiose, et que d'autre part, l'acide L glutamique 1/2 aldéhyde et l'acide Δ_1 pyroline 5 carboxylique sont en équilibre (réaction non enzymatique), si le blocage de l'utilisation est d'ordre métabolique, il est probablement localisé à la réaction 1.

Il nous reste donc à étudier cette étape que constitue le passage de la L proline à l'acide Δ_1 pyroline 5 carboxylique. Il s'agit d'une réaction catalysée par la proline oxydase.

Cette proline oxydase semble avoir été peu étudiée chez les levures. D'après JOHNSON et STRECKER (1961), la proline oxydase ferait intervenir le NAD, le NADP cytochrome c réductase et le système des cytochromes.

S'il en est ainsi pour la proline oxydase de la levure, il est possible d'envisager que ce soit cette réaction d'oxydation de la proline qui nécessite la présence d'oxygène. C'est pourquoi nous avons eu l'idée de tester l'effet du cyanure et de l'antimycine (0,8 µg/g levure) connus pour bloquer, l'un, la chaîne des cytochromes, l'autre, spécifiquement le cytochrome c, sur l'activité de la proline oxydase, l'effet sur la respiration servant de moyen de contrôler l'effet réel du produit sur la chaîne respiratoire (fig. 10).

Le cyanure n'a pas eu d'effet notable sur l'activité de la proline oxydase, ce qui est en accord avec les données bibliographiques, ce produit ayant peu d'effet chez les levures (18).

En revanche, l'antimycine bloque l'activité de la proline oxydase et bloque provisoirement la respiration. Donc, c'est à ce niveau qu'intervient l'oxygène indispensable à l'utilisation de la proline.

2. The second part of the document focuses on the financial aspects of the organization. It provides a detailed overview of the budget, including the projected income and expenses for the upcoming year. This section also discusses the various financial risks that the organization may face and the strategies used to mitigate these risks. The goal is to ensure that the organization remains financially stable and able to meet its obligations.

3. The third part of the document addresses the human resources of the organization. It discusses the current state of the workforce, including the number of employees, their skills, and their experience. This section also outlines the various initiatives used to attract and retain top talent, such as training and development programs. The goal is to ensure that the organization has a strong and capable workforce that is able to meet the challenges of the future.

4. The fourth part of the document discusses the organization's relationship with its stakeholders. It identifies the various groups that have an interest in the organization, such as customers, suppliers, and the community. This section also outlines the various strategies used to engage these stakeholders and ensure that their needs are met. The goal is to build strong and lasting relationships with all stakeholders, which is essential for the long-term success of the organization.

5. The fifth part of the document discusses the organization's environmental impact. It outlines the various measures used to reduce the organization's carbon footprint and promote sustainability. This section also discusses the various initiatives used to support the local community and promote social responsibility. The goal is to ensure that the organization is not only profitable but also socially and environmentally responsible.

6. The sixth part of the document discusses the organization's future plans. It outlines the various goals and objectives that the organization has set for the next five years. This section also discusses the various strategies used to achieve these goals, such as innovation and research and development. The goal is to ensure that the organization is well-positioned to meet the challenges of the future and achieve long-term success.

7. The seventh part of the document discusses the organization's governance structure. It outlines the various roles and responsibilities of the board of directors and the management team. This section also discusses the various policies and procedures used to ensure that the organization is governed in a transparent and accountable manner. The goal is to ensure that the organization is well-governed and able to meet the needs of its stakeholders.

8. The eighth part of the document discusses the organization's overall performance. It provides a summary of the organization's achievements over the past year, including its financial performance, its human resources, and its relationship with its stakeholders. This section also discusses the various challenges that the organization has faced and the strategies used to overcome these challenges. The goal is to provide a clear and concise overview of the organization's performance and its future prospects.

9. The ninth part of the document discusses the organization's commitment to excellence. It outlines the various measures used to ensure that the organization is always striving for the highest quality of service. This section also discusses the various initiatives used to promote a culture of excellence throughout the organization. The goal is to ensure that the organization is always at the forefront of its industry and able to provide the best possible service to its customers.

10. The tenth part of the document discusses the organization's commitment to innovation. It outlines the various measures used to encourage and support innovation within the organization. This section also discusses the various initiatives used to promote a culture of innovation throughout the organization. The goal is to ensure that the organization is always looking for new and creative ways to improve its products and services and stay ahead of the competition.

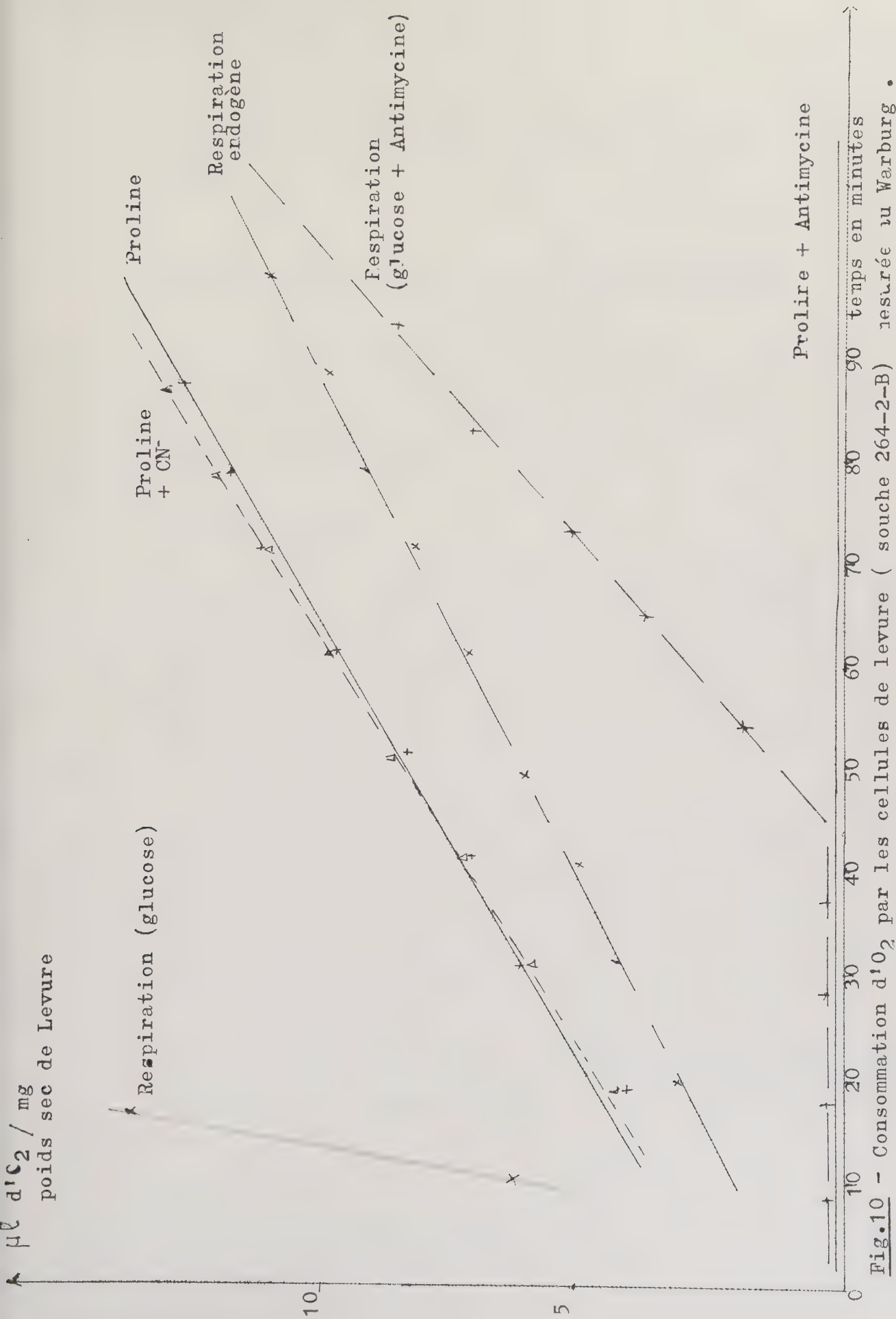


Fig.10 - Consommation d' $^{14}\text{O}_2$ par les cellules de levure (souche 264-2-B) mesurée au Warburg .

La consommation de proline par la proline oxydase est d'environ 5 μ g proline par mg de poids sec de levure et par heure.

C. Action de l'oxygène sur la biosynthèse enzymatique

L'assimilation de la proline n'ayant lieu qu'en aérobiose, il est possible d'envisager que l'oxygène soit nécessaire à la biosynthèse d'un système enzymatique ou perméasique (SLONIMSKII 1953) réprimée par le sulfate d'ammonium et normalement déréprimée après épuisement de celui-ci .

1) Proline oxydase

La fig. 11 nous montre que pour *Saccharomyces cerevisiae* 264-2 B cultivé sur milieu synthétique en aérobiose ou anaérobiose, la consommation d'oxygène est sensiblement la même dès le début. Donc le caractère aérobie ou anaérobie de la préculture n'influe pas sur l'activité de la proline oxydase. On peut toutefois se demander si ceci est vrai lorsque l'anaérobiose est aussi sévère que celle réalisée en brasserie .

Pour le contrôler, nous avons effectué un prélèvement de moût au bout de trois jours de fermentation en anaérobiose dans des cuves ouvertes (tous les amino-acides sont épuisés, sauf la proline) . Vingt ml. de cet échantillon sont incubés en aérobiose et vingt autres en anaérobiose. Au bout de 4 heures, après centrifugation et lavage des cellules, nous avons mesuré comme précédemment l'activité de la proline oxydase (fig. 12)

Nous obtenons toujours des résultats identiques, ce qui confirme que les conditions de préculture n'ont aucun effet sur l'activité de la proline oxydase .

...the ... of ...
...the ... of ...

THE ...

...the ... of ...
...the ... of ...
...the ... of ...

THE ...

...the ... of ...
...the ... of ...
...the ... of ...

...the ... of ...
...the ... of ...
...the ... of ...

...the ... of ...
...the ... of ...
...the ... of ...

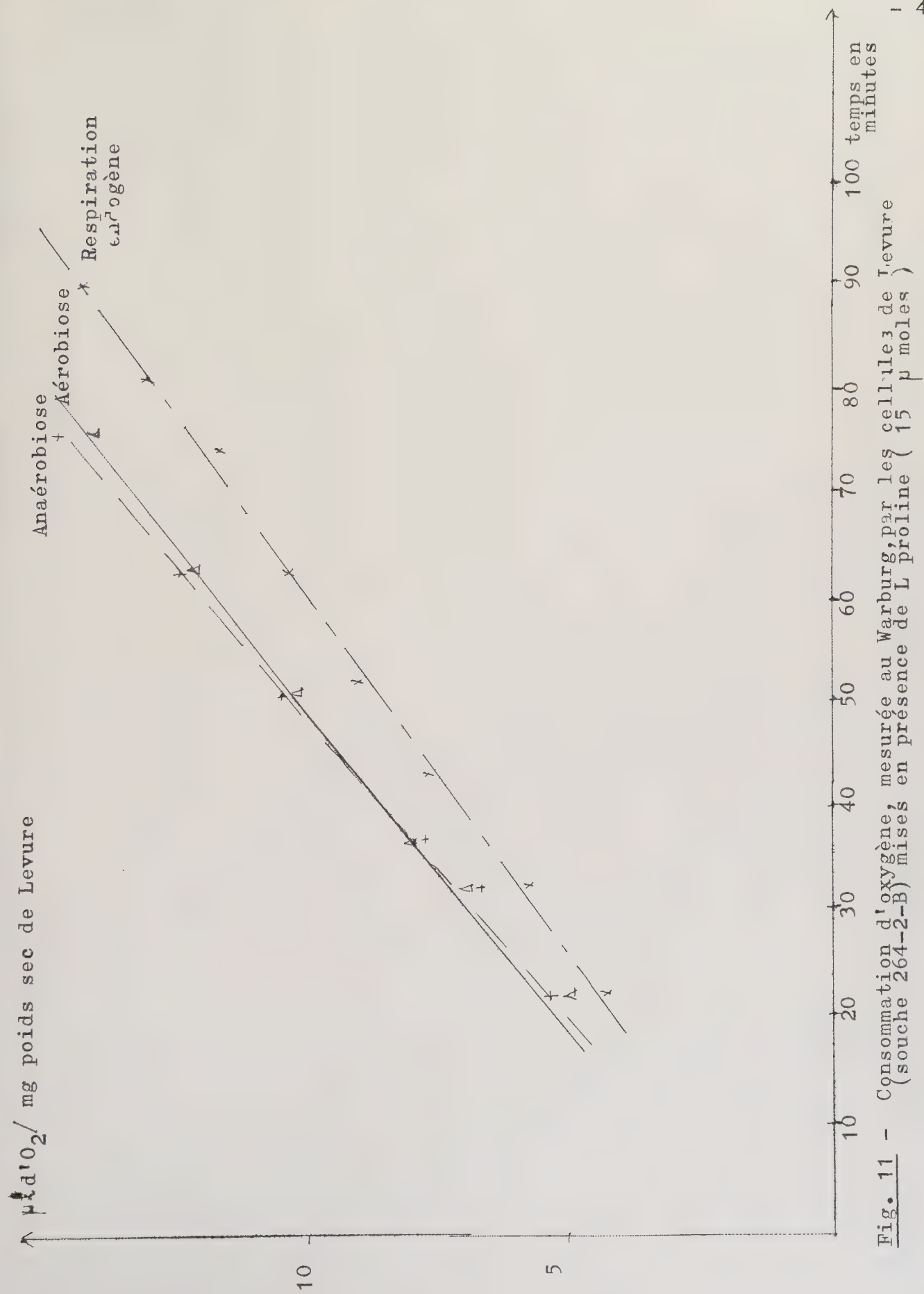


Fig. 11 - Consommation d'oxygène, mesurée au Warburg, par les cellules de levure (souche 264-2-B) mises en présence de L proline (15 μ moles)

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

$\mu\text{mol O}_2/\text{mg}$ poids sec de levure

Anaérobie

Préincubation
Aérobie

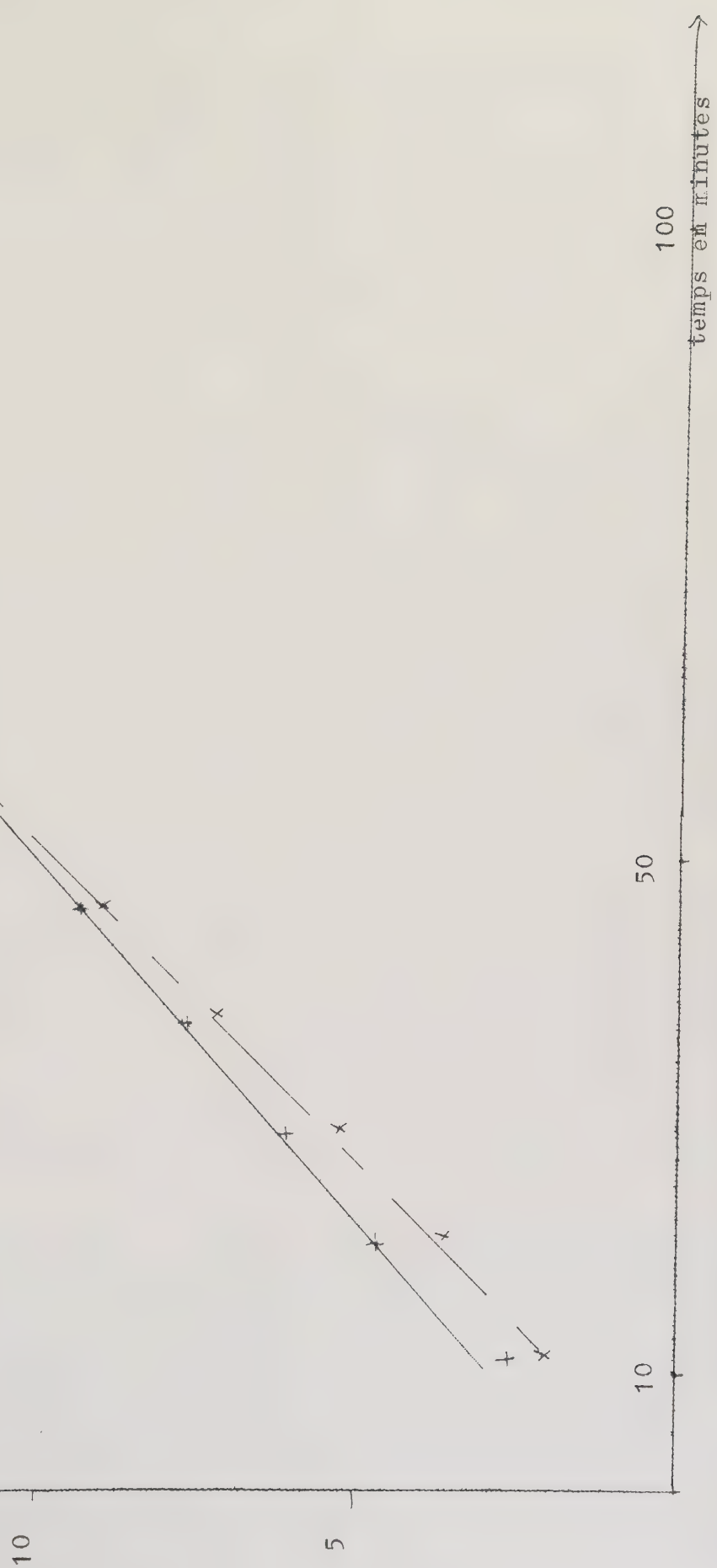


Fig. 12 - Consommation d'oxygène, mesurée au Warburg par les cellules de levure
 (souche de brasserie) mises en présence de L proline ($15 \mu\text{mol/s}$)

2) Etude de la pénétration de la proline dans la cellule

La pénétration de la $L^{14}C$ proline a été étudiée d'une part sur la souche 264-2 B cultivée sur milieu synthétique, d'autre part sur de la levure prélevée en brasserie au cours de la fermentation .

Avec la souche 264-2 B, en aérobiose, on constate une élévation rapide du taux de proline marquée, suivie d'une stabilisation après environ 30 minutes (fig. 13)

Avec la même souche 264-2 b, précultivée soit en aérobiose, soit en anaérobiose, la pénétration de ^{14}C Proline en anaérobiose donne des courbes analogues, mais le taux de ^{14}C Proline se stabilise à une valeur plus faible (fig. 13)

Cette stabilisation s'interprète facilement si l'on suppose que cette proline est incorporée dans les protéines, mais n'est pas dégradée. En effet, si elle était dégradée, la proline servant de source d'azote, le taux de ^{14}C proline dans la cellule devrait continuer à croître. Au contraire, si cette proline est uniquement incorporée dans les protéines, on conçoit que le taux de ^{14}C proline se stabilise à une valeur correspondant au taux de proline dans les protéines cellulaires (Tableau III)

Or, le calcul du taux de stabilisation de la ^{14}C proline intracellulaire donne $19,3 \mu g/mg$ de poids sec de levure et le calcul, à partir des analyses de protéines, donne $15,5 \mu g$ par mg de poids sec de levure ; le pool donne $6,9 \mu g$ par mg de poids sec de levure . Ces résultats sont donc en accord avec l'hypothèse.

Rappelons que les résultats qui précèdent sont obtenus lors de l'addition de proline à une culture sur un milieu au sulfate d'ammonium .

Or, SCHWENCKE (26) a récemment mis en évidence une perméase spécifique de la proline chez *Saccharomyces Chevalieri* et montré qu'elle est réprimée par le sulfate d'ammonium.

Il est possible de penser qu'une telle perméase est réprimée également en présence de nombreux acides aminés, par exemple au cours de la fermentation en brasserie . Lorsque ces acides aminés sont épuisés, une dérepression devrait permettre l'absorption

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DIVISION OF THE PHYSICAL SCIENCES

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
5301 SOUTH CAMPUS DRIVE
CHICAGO, ILLINOIS 60637

TO THE EDITOR OF THE JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY
1901 N. YARWOOD DRIVE
ANN ARBOR, MICHIGAN 48106

RE: [Illegible Title]

Dear Sir:

I am pleased to inform you that the manuscript of the paper entitled "[Illegible Title]" has been accepted for publication in the JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. The paper was received by the Editor on [Illegible Date] and has been assigned to the Editor-in-Chief, [Illegible Name].

The paper is scheduled to appear in the [Illegible Volume] issue of the JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, which will be published in [Illegible Month/Year]. The paper will be published under the title "[Illegible Title]" and will be assigned to the Editor-in-Chief, [Illegible Name].

I am sure that the paper will be of great interest to the readers of the JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. The paper is a contribution to the field of [Illegible Field] and will provide a valuable addition to the literature of the subject.

I am sure that the paper will be of great interest to the readers of the JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. The paper is a contribution to the field of [Illegible Field] and will provide a valuable addition to the literature of the subject.

I am sure that the paper will be of great interest to the readers of the JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. The paper is a contribution to the field of [Illegible Field] and will provide a valuable addition to the literature of the subject.

I am sure that the paper will be of great interest to the readers of the JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. The paper is a contribution to the field of [Illegible Field] and will provide a valuable addition to the literature of the subject.

% de proline
pénétrée dans la cellule

2 %

1 %

Aérobiose

Anaérobiose (préculture
aérobie)

Anaérobiose (préculture
anaérobiose)

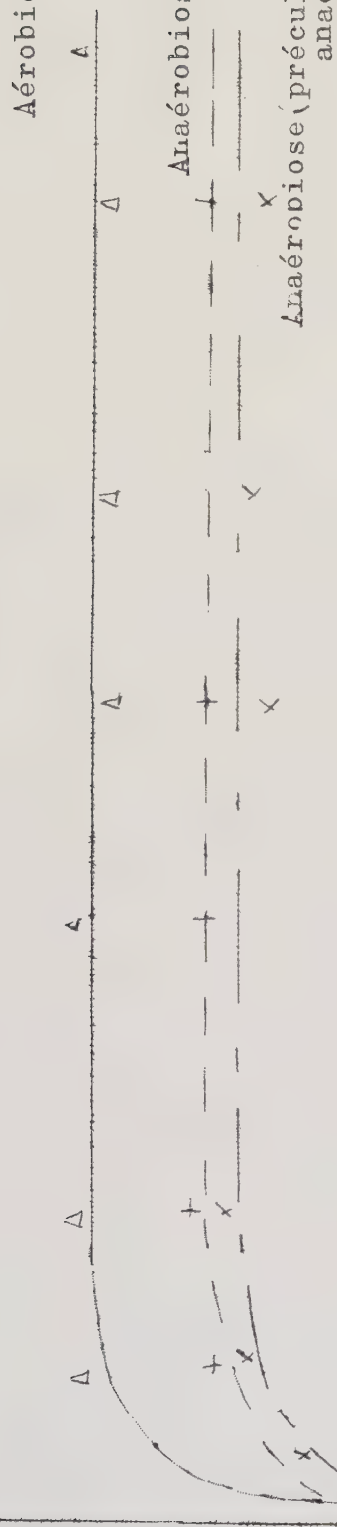


Fig. 13 - Etude de la pénétration de L C proline dans les cellules de levure (série 264-2-B)

de la L proline ; comme cette absorption n'a pas lieu normalement en brasserie, il est possible de supposer que les conditions très particulières (en particulier le faible potentiel d'oxydo-réduction) empêchent la biosynthèse de cette perméase .

Aussi, du moût de fermentation a été prélevé dans des conditions strictement anaérobies, le 3^e jour (après élimination de tous les amino-acides, sauf la proline) . 20 ml sont incubés en aérobiose et 20 ml en anaérobiose en présence de L¹⁴C proline.

Au cours d'une expérience analogue, un 3^e échantillon a été incubé en présence d'actidione, inhibiteur de la synthèse protéique

La pénétration de L¹⁴C proline est mesurée au cours du temps (fig. 14 - 15 - 16)

Nous constatons qu'en aérobiose se produit une pénétration importante de proline. La vitesse de pénétration croît d'ailleurs en fonction du temps et du poids sec de levure par ml, ce qui montre qu'il se produit une synthèse de perméase (13). En anaérobiose la pénétration est faible et sa vitesse n'augmente pas ; il n'y a donc pas synthèse de perméase . En aérobiose, et en présence d'actidione, inhibiteur de la synthèse protéique, la pénétration est encore plus faible qu'en anaérobiose. Ceci confirme que l'entrée de la proline nécessite la synthèse préalable d'une protéine qui est probablement la perméase spécifique mise en évidence par SCHWENCKE chez *Saccharomyces Chevalieri* (26).

La faible pénétration de proline que l'on retrouve dans les expériences faites en anaérobiose pourrait être due à la présence d'une seconde perméase. M.GRENSON (9, 10, 11) a montré qu'il existerait chez *Saccharomyces Cerevisiae*, dans le cas de l'arginine, de la lysine et de la méthionine, une perméase spécifique de chacun de ces amino-acides et une autre perméase non spécifique. Il en serait peut-être de même dans le cas de la L proline. La perméase non spécifique pourrait permettre une pénétration de la proline, suffisante pour couvrir les besoins en proline, mais insuffisante pour permettre la croissance de la levure avec de la proline comme seule source azotée .

1. The first part of the paper is devoted to a general discussion of the problem.

2. In the second part, we shall consider the case of a homogeneous medium.

3. The third part is devoted to the case of an inhomogeneous medium.

4. In the fourth part, we shall consider the case of a medium with a periodic structure.

5. The fifth part is devoted to the case of a medium with a random structure.

6. In the sixth part, we shall consider the case of a medium with a fractal structure.

7. The seventh part is devoted to the case of a medium with a self-similar structure.

8. In the eighth part, we shall consider the case of a medium with a hierarchical structure.

9. The ninth part is devoted to the case of a medium with a complex structure.

10. In the tenth part, we shall consider the case of a medium with a chaotic structure.

11. The eleventh part is devoted to the case of a medium with a non-linear structure.

12. In the twelfth part, we shall consider the case of a medium with a non-local structure.

13. The thirteenth part is devoted to the case of a medium with a non-integer dimension.

14. In the fourteenth part, we shall consider the case of a medium with a non-integer order.

15. The fifteenth part is devoted to the case of a medium with a non-integer exponent.

16. In the sixteenth part, we shall consider the case of a medium with a non-integer power.

17. The seventeenth part is devoted to the case of a medium with a non-integer derivative.

18. In the eighteenth part, we shall consider the case of a medium with a non-integer integral.

19. The nineteenth part is devoted to the case of a medium with a non-integer product.

20. In the twentieth part, we shall consider the case of a medium with a non-integer division.

% de proline pénétrée dans la cellule
par mg poids sec de levure

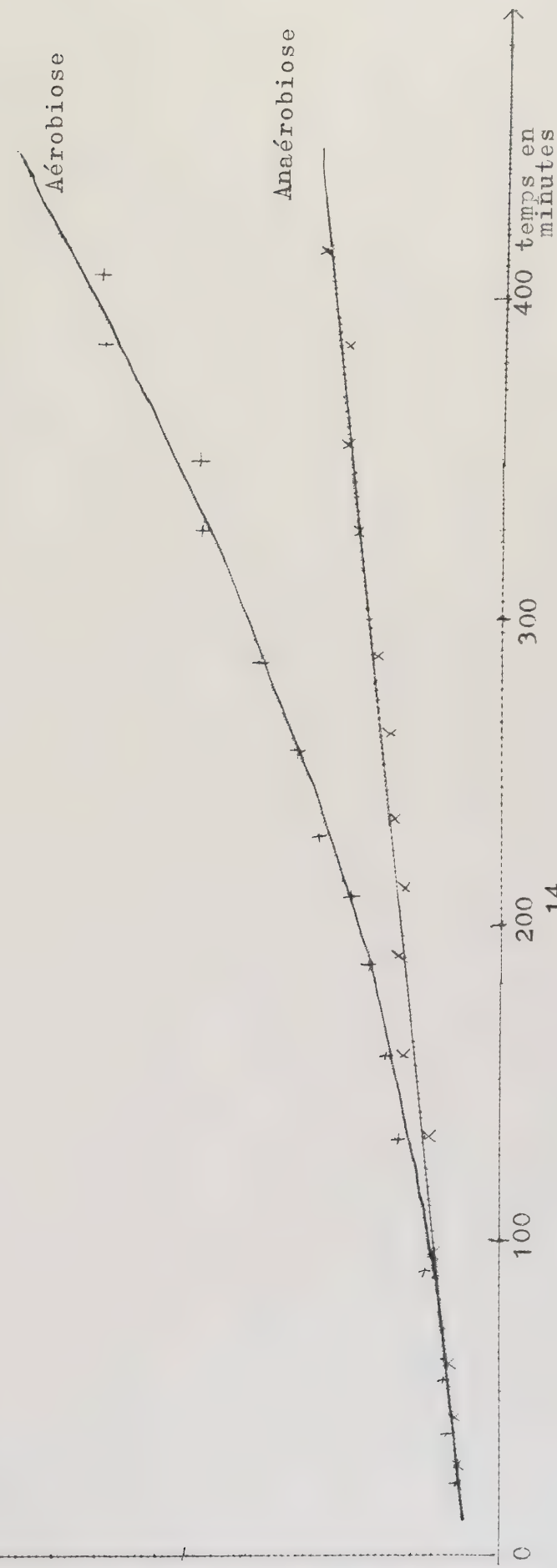
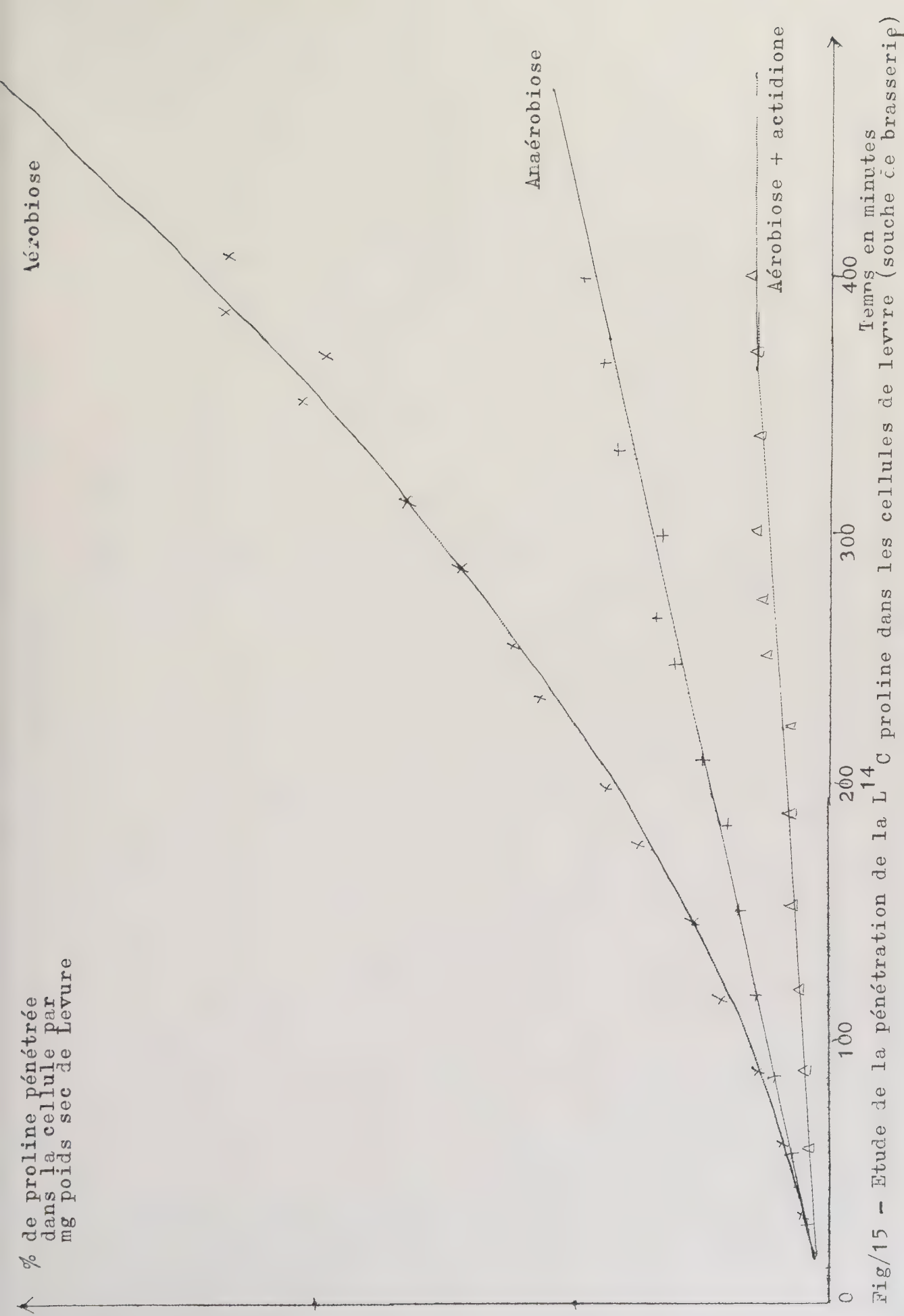


Fig. 14 - Etude de la pénétration de la L¹⁴C proline dans les cellules de levure (souche de brasserie)



Fig/15 - Etude de la pénétration de la $L^{14}C$ proline dans les cellules de levure (souche de brasserie)

Proline pénétrée par mg poids sec, par heure

Aérobiose

Anaérobiose

2,0

3,0

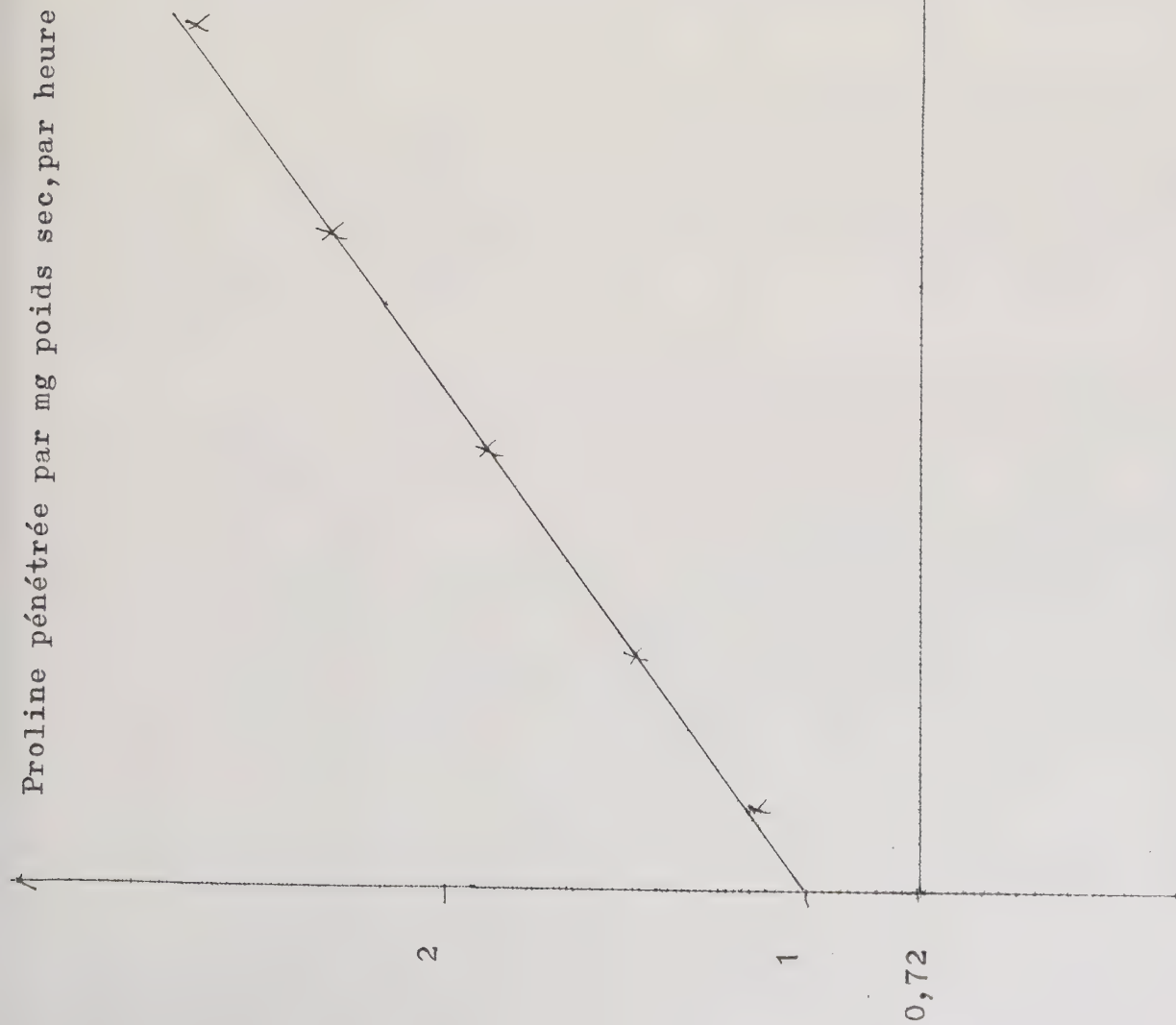
4,0 poids sec
levure en μg /ml

Vitesse de pénétration de la L^{14}C proline dans la cellule de levure (srouche de brasserie)

Fig. 16 -

53

1



C O N C L U S I O N

Nous avons essayé de découvrir les raisons pour lesquelles **la proline**, non assimilée de façon sensible en anaérobiose, même après disparition des autres sources azotées du milieu, était assimilée en aérobiose par les levures après épuisement du sulfate d'ammonium.

Il semble que deux phénomènes interviennent :

- 1) Il y a d'une part, blocage du catabolisme de la proline au niveau de la réaction proline $\longrightarrow$ acide Δ_1 , pyrroline 5 carboxylique, catalysée par la proline oxydase, lorsque l'on se trouve en anaérobiose, la proline oxydase ne fonctionnant qu'en présence d'oxygène.
- 2) D'autre part, les résultats obtenus nous permettent de penser qu'en l'absence de sulfate d'ammonium et en aérobiose, il y a synthèse d'une perméase assurant une importante pénétration de proline permettant à cet acide aminé de jouer le rôle de source d'azote.

La pénétration beaucoup plus faible enregistrée en anaérobiose s'expliquerait par l'intervention d'une seconde perméase, non spécifique de la proline, comme cela a été mis en évidence par GRENSON dans le cas de l'arginine, de la lysine et de la méthionine. Cela est en accord avec les différentes expériences effectuées sur des moûts de brasserie où en anaérobiose, une légère absorption de proline est décelée dans tous les cas, même en présence d'autres sources azotées.

R E S U M E

L'étude du métabolisme de la proline lors des fermentations de brasserie nous a montré que la proline, non assimilée en anaérobiose, pouvait l'être en aérobiose après élimination des autres sources azotées.

Les résultats que nous avons obtenus permettent de penser que deux phénomènes interviennent :

- l'oxygène est nécessaire à l'oxydation de la proline, première étape de sa dégradation, catalysée par la proline oxydase,
- une perméase spécifique de la proline, réprimée en présence de sulfate d'ammonium ou d'autres sources azotées, ne peut être dérèprimée qu'en aérobiose.

- 1 - ABELSON P.H., VOGEL H.J., (1955)
Jour. Biol. Chem. - 213-355
- 2 - BLACK S., WRIGHT N.G., (1953)
Jour. Am. Chem. Soc. - 75-5766
- 3 - BLOCK R.J., BOLLING D., (1943)
Arch. Biochem. - a, 3-127 - b, 6-277 - (1945) - 7-313
- 4 - BOURGEOIS C., (1969)
Bull. Soc. Chim. Biol. - 51 - 5 - 935
- 5 - De BUSK B.G., De BUSK A.G., (1965)
Biochem., Biophys. Acta - 104-139
- 6 - COOK A.H., (1958)
The Chemistry and Biology of Yeast - 437
- 7 - FINCHAM J.R.S. (1953)
Biochem. Jour. - 53-313
- 8 - GAY R., (1964)
Bull. Anc. E.B.N. - Juillet-Août - 98
- 9 - GRENSON M., MOUSSET M., WIAME J.M., BECHET J., (1966)
Biochem. Biophys. Acta. - 127-325
- 10 - GRENSON M., (1966)
Biochem. Biophys. Acta. - 127-339
- 11 - GRENSON M., GITS J.J., (1967)
Biochem. Biophys. Acta. - 135-507
- 12 - De HAUWER G., LAVALLE R., WIAME J.M., (1964)
Biochem. Biophys. Acta. - 81-257
- 13 - JONES M., PIERCE J.S., (1963)
Eur. Brew. Conv. - 101
- 14 - JONES M., PIERCE J.S., (1964)
Jour. Inst. Brew. - 70-307
- 15 - JONES M., POWER, PIERCE J.S., (1965)
Eur. Brew. Conv. - 182
- 16 - JONES M., PIERCE J.S., (1966)
Tech. Quat. - 3-4 - 231

- 17 - JONES M., PIERCE J.S., (1969)
Eur. Brew. Conv. - non publié
- 18 - KARLSON P., (1964)
Biochimie - Ed. Doin, Paris
- 19 - LAISHLEY E.J., BERNLOHR R.W., (1968)
Jour. Bactériol. - 96-322
- 20 - LEWIS M.J., (1964)
Wall. Lab. Comm. - 27-29
- 21 - MEISTER A., (1965)
Biochemistry of the Amino-Acids - II - 107
- 22 - MOAT A.G., AHMAD F., (1965)
Wall. Lab. Comm. - 96-111
- 23 - MONOD J., COHEN G.N.- 1957 - Bacteriol Rev. 21- 169
- 24 - PEYNAUD E., LAFON-LAFOURCADE S., (1967)
Rev. Ferm. Ind. Alim. - 17-II
- 25 - RIBEREAU - GAYON J., PEYNAUD E., (1966)
Ann. Nut. Alim. - 20 - 1
- 26 - SCHWENCKE J., (1969)
Biochem. Biophys. Acta. - 173-302
- 27 - SIMS A.P., FOLKES B.F., (1964)
Proc. Roy. Soc. (London) - Ser. B - 159-479
- 28 - SPACKMANN, MOORE, STEIN, (1958)
Ann. Chem. - 30-1190
- 29 - STICKLAND L.H., (1934) - Biochem. Jour. - 28-1746
(1935) - Biochem. Jour. - 29-288
- 30 - SURDIN Y., (1965)
Biochem. Biophys. Acta. - 107-546
- 31 - TAYLOR E.S., (1947)
Jour. Gen. Microbiol. - 1-86
- 32 - Technicon Information (1966) - Mars - 9
- 33 - THORNE R.S.W., (1944)
Jour. Inst. Brew. - 50-186
- 34 - THORNE R.S.W., (1945)
Jour. Inst. Brew. - 51-6

- 35 - THORNE R.S.W., (1949)
Jour. Inst. Brew. - 55-201
- 36 - VOGEL M.J., DAVIES B.D., (1952)
Jour. Am. Chem. Soc. - 74-109
- 37 - VOGEL M.J., BONNER D.H., (1954)
Proc. Nat. Acad. Sci. - U.S. - 40-688
- 38 - WIAME J.M., STORCK R., (1953)
Biochem. Biophys. Acta. - 10-268
- 39 - WICKERHAM L.J., (1951)
Taxonomy of Yeast in Techn. Bull. - n° 1029 - U.S. -
Dept. Agric. Washington D.C. - 56
- 40 - WREN J.J., WIGGALL P.H., (1965)
Biochem. J. - 24-216

D E U X I E M E T H E S E

proposition donnée par la Faculté

Quelques aspects du métabolisme
des boues activées

Vu, approuvé
et permis d'imprimer

Nancy, le

LE DOYEN

J. AUBRY.

